

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências**

**Greicy Brisa Malaquias Dias**

Desenvolvimento de linhagens TcI e TcII de *Trypanosoma cruzi*  
expressando proteínas fluorescentes para estudo da interação  
parasito-hospedeiro

Florianópolis  
2016



**Greicy Brisa Malaquias Dias**

Desenvolvimento de linhagens TcI e TcII de *Trypanosoma cruzi*  
expressando proteínas fluorescentes para estudo da interação  
parasito-hospedeiro

Tese de doutorado submetida  
ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia e Biociências  
da Universidade Federal de  
Santa Catarina para obtenção  
do título de Doutor em  
Biotecnologia e Biociências

**Orientador: Dr. Mário Steindel**

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dias, Greicy Brisa Malaquias

Desenvolvimento de linhagens TcI e TcII de Trypanosoma cruzi expressando proteínas fluorescentes para estudo da interação parasito-hospedeiro / Greicy Brisa Malaquias Dias ; orientador, Mário Steindel - Florianópolis, SC, 2016. 120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

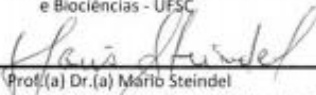
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Trypanosoma cruzi. 3. infecção oral. 4. infecção mista. I. Steindel, Mário. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**"Desenvolvimento de linhagens TcI e TcII de *Trypanosoma cruzi* expressando proteínas fluorescentes para estudo da interação parasito-hospedeiro"**

Por

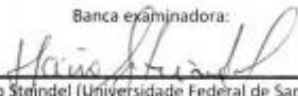
**Greicy Brisa Malaquias Dias**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (36/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC

  
Prof. (a) Dr. (a) Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências


Banca examinadora:

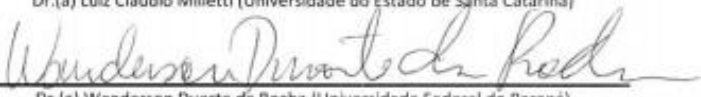
  
Dr. (a) Mario Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr. (a) Andre Luiz Barbosa Báfica (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr. (a) Glauber Wagner (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr. (a) Iriane Eger (Universidade Estadual de Ponta Grossa)

  
Dr. (a) Luiz Cláudio Milletti (Universidade do Estado de Santa Catarina)

  
Dr. (a) Wanderson Duarte da Rocha (Universidade Federal do Paraná)

Florianópolis, 16 de dezembro de 2016.



## **DEDICO ESTE TRABALHO**

Aos meus avós Marlene e João  
que partiram tão cedo deixando  
um imenso vazio.





## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que todos os dias me concede o dom da vida e que em todos os instantes me ensina como melhor conduzi-la.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e financiamento da pesquisa.

Ao Professor Mário Steindel, pelos ensinamentos científicos, culinários e pessoais que ajudaram ao longo desses anos a transformar a minha visão sobre ciência e profissionalismo. Você é um exemplo de ética e responsabilidade, uma das pessoas mais simples e sinceras que já conheci. Obrigada pela oportunidade, pelo carinho, pelos puxões de orelha às vezes necessários e por me incentivar a sempre fazer o melhor.

Aos membros da banca Professora Iriane Eger, Professores Wanderson Duarte da Rocha, Luiz Miletto, André Báfica, Glauber Wagner, Maurílio José Soares e Rafael Rosa pela disposição em avaliar esse trabalho e contribuir para o meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Professor Edmundo Grisard, pela prontidão em ajudar, pelos conselhos científicos, pelas brincadeiras e risadas no corredor e por cuidar com tanto esmero do nosso laboratório. À Professora Patrícia Stocco (Pati) por incalculáveis vezes sanar minhas dúvidas acerca de tantas técnicas novas para mim, pelos docinhos deliciosos nas segundas-feiras, pela parceria na decoração de festas e por ser um exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos Professores Carlos José Pinto e Glauber Wagner pelos conselhos e por toda a ajuda no início da minha carreira como docente. Obrigada pelas conversas e por toda a diversão envolvida no ensino da parasitologia.

Aos meus colegas do Laboratório de Protozoologia por estarem comigo todos os dias ao longo desses quatro anos, compartilhando as alegrias e frustrações da vida acadêmica e científica. Nunca esquecerei as madrugadas no laboratório, as conversas no corredor, festas juninas, jantares, feijoadas e churrascos. Vocês estarão para sempre no meu coração: Abadio Júnior, Adriana Correa, Aline Schlindwen, Ana Paula Gruending, Ana Paula Machado do Nascimento, Bruno Tavares, Carime Lessa, Carine Moreira, Carolina Coelho, Caroline da Cunha, Danna Moura, Débora Luckmeyer, Elisa Prestes, Gustavo

Campagnaro, Ibeth Calderon, Ingrid Beltrame, Jair Telles, Laís Yamanaka, Lucas Dhom, Maiko Tonin, Mariel Marlow, Milene Moraes, Natália Gutierrez, Ninna Granucci, Tatiana Catecati, Thais Assis, Thaynara Pereira, Vagner Portes.

Ao Professor André Báfica pelas produtivas conversas sobre ciência e sobre a vida. A todos os membros do LIDI, LIA e LVA pela disposição em ajudar.

Aos funcionários do LAMEB, Bibiana Sgorla, Camille Ribeiro, Chirle Ferreira, Denis Agnolo, Emily dos Santos e Vanessa da Silva pelos finais de semana que fiz alguns de vocês terem que trabalhar (sinto por isso, mas não tinha outro jeito!) e por sempre acharem um tempinho para encaixar meus experimentos quando todos os horários estavam ocupados. Bibi e Vanessa, vocês são ótimas!

À Aninha, a filha que ganhei de presente durante o doutorado, por toda ajuda e incentivo e por sempre me dizer que tudo vai dar certo. Às queridas Carine e Ingrid, por estarem sempre presentes me ajudando e me dando forças para enfrentar os desafios diários do doutorado e ao Vagner e Thaise pela amizade e parceria.

À minha amiga Ana Paula, parceira de trabalho, de praia, de festa, de vida. Obrigada por toda a ajuda com os experimentos, principalmente com a histologia, por todos os repiques fora de hora e grana emprestada até que o dinheiro da bolsa estivesse na conta (foram algumas vezes...rs). Obrigada por tornar os dias no laboratório mais alegres e leves. Foco, força e fé no término da sua tese.

Ao Cristiano, presente que Floripa me deu, pelo amor, pela paciência em tentar me ensinar a surfar e por fazer os meus dias muito mais felizes. Com certeza sem você as coisas não teriam o mesmo sentido. Te amo!

Aos meus pais Wagner e Valéria por me incentivarem e acreditarem em mim, tentando me proporcionar sempre o melhor. Aos meus irmãos Gabriela e João Vitor por compartilharem a vida comigo e por torcerem sempre pelas minhas conquistas. À Luiza, raio de sol que veio iluminar a todos nós. À minha tia Magda, por ser como uma mãe e pelas infundáveis conservas ao telefone e orações. À minha vózinha Cida por todo o amor e carinho dedicados a mim. Amo muito todos vocês!

Aos amigos e colegas que de diferentes maneiras participaram do desenvolvimento desse trabalho, me incentivando e contribuindo para a minha formação profissional e pessoal.



*Tenho em mim todos os sonhos  
do mundo*  
Fernando Pessoa



## RESUMO

Surtos de doença de Chagas aguda associados à transmissão pela via oral têm sido reportados no Brasil e em outros países da América do Sul. Contudo, estudos sobre a dinâmica da infecção por via oral ainda são incipientes. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a interação *in vitro* e *in vivo* de linhagens transfectadas de *T. cruzi* TcI e TcII com plasmídeos pTREXRFP/GFPNeo e pROCKGFPNeo. Para tanto, foram geradas linhagens da cepa SC25 (TcI) e SC96 (TcII) expressando de maneira estável as proteínas fluorescentes RFP e GFP, respectivamente. A cepa Y expressando GFP foi utilizada em ensaios de interação parasito-hospedeiro. Estudos *in vitro* mostraram que a transfecção não alterou o crescimento e a capacidade de infecção das cepas. Ensaios de co-infecção em células THP-1 mostraram que misturas de parasitos TcI e TcII em diferentes proporções apresentaram níveis de infecção inferiores aos observados para as cepas em infecções isoladas e que uma mesma célula comporta a infecção pelas duas linhagens de parasitos. Triatomíneos infectados isoladamente com cada uma das cepas transfectadas apresentaram taxa de infecção semelhante. Contrariamente, infecções mistas nos insetos mostraram um predomínio de parasitos da linhagem TcII. Em camundongos a infecção pela via oral da cepa TcI não foi capaz de induzir parasitemia sanguínea detectável nos animais. Por outro lado, a cepa YGFP ocasionou parasitemia sanguínea patente e nas inoculações com misturas de TcI e TcII, apenas parasitos TcII foram detectados no sangue e tecidos de animais infectados. O tratamento de tripomastigotas da cepa SC25RFP com pepsina reduziu significativamente sua capacidade de infecção em células THP-1, sugerindo que a passagem pelo ambiente gástrico pode ter interferido negativamente na infecção de camundongos pela via oral. A avaliação histopatológica mostrou que o processo inflamatório na fase aguda foi mais intenso e com presença de parasitismo apenas no tecido cardíaco para a cepa YGFP. Na fase crônica a inflamação foi reduzida e não foram encontrados parasitos visíveis nos tecidos avaliados. Contudo, a PCR revelou a presença de DNA do parasito em todos os tecidos examinados. Os resultados do presente trabalho sugerem que a dinâmica da co-infecção está mais associada às características das cepas de *T. cruzi* do que a

linhagem genética (DTU) à que elas pertencem. Parasitos transfectados expressando genes repórteres distintos pode ser uma ferramenta útil no estudo da dinâmica de infecção mista.

**Palavras-chave:** via oral, infecção mista, RFP, GFP, *Trypanosoma cruzi*.



## ABSTRACT

Acute Chagas' disease outbreaks associated with oral transmission have been reported in Brazil and other South American countries. However, oral infection dynamics studies are still incipient. The present work aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* interaction of *T. cruzi* TcI and TcII transfected strains with plasmids pTREXRFP / GFPNeo and pROCKGFPNeo. Transfected SC25 (TcI) and SC96 (TcII) strains were showed stable RFP and GFP fluorescent proteins expression, respectively. Y strain expressing GFP was used in parasite-host interaction assays. *In vitro* studies showed that transfection did not affected the strains growth. Co-infection assays in THP-1 cells showed that mixtures of TcI and TcII parasites in different proportions had lower levels of infection than those observed for the isolated strains and that the same cell carries infection by the two strains of parasites. Triatomines infected with each transfected strains showed a similar infection rate. In contrast, mixed infections showed a predominance of TcII lineage parasites in the insect gut. In mice, oral infection with TcI strain was not able to induce detectable blood parasitemia in the animals. On the other hand, the YGFP strain caused patent blood parasitemia and in mixed infections only TcII parasites were detected in blood and tissues of infected mice. Treatment of trypomastigotes of the SC25RFP strain with pepsin significantly reduced their ability to infect THP-1 cells, suggesting that passage through the gastric environment may have interfered with the parasite capacity to infect mice by oral route. The histopathological evaluation showed that inflammatory process was more intense in the acute phase and YGFP parasites were detected only in heart. In the chronic phase inflammation was reduced and no visible parasites were found in the evaluated tissues. However, PCR revealed parasite DNA in all examined tissues. The present work suggest that co-infection dynamics is more associated with the *T. cruzi* strain characteristics than the genetic lineage (DTU) to which they belong. Transfected parasites expressing different reporter genes may be a useful tool for the study of mixed infection dynamic.

**Key-words:** oral route, mixed infection, RFP, GFP, *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

cm<sup>2</sup> – centímetro quadrado

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

d.p.i. – dias pós infecção

DTU – do inglês *Discrete typing units*

DTDs – do inglês *Neglected Tropical Diseases*

GFP – proteína verde fluorescente (do inglês *Green Fluorescent Protein*)

G418 – Geneticin

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LIT – do inglês *Liver Infusion Triptose*

M – molar

mM – milimolar

ml – mililitro

ng – nanograma

nm – nanômetro

pb – pares de base

PBS – tampão salina fosfato, pH 7,4 (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – do inglês *Polymerase chain reaction*

RFP – proteína vermelha fluorescente (do inglês *Red Fluorescent Protein*)

rpm – rotações por minuto

µg – micrograma

µl – microlitro

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.....24

**Figura 2:** Esquema representativo dos vetores de expressão: (A) pROCKGFPNeo e (B) pTREXGFP/RFPNeo.....42

**Figura 3:** Perfis de DNA obtidos através da amplificação do gene do mini-éxon de *T.cruzi*. PM: Padrão de peso molecular (plasmídeo pUC digerido com a enzima *Hae* III); Tcl: Cepa Colombiana representativa da DTU Tcl; TcII: Cepa Y representativa da DTU TcII; CN: Controle negativo da reação de amplificação.....51

**Figura 4:** Expressão de RFP e GFP pelas formas epimastigotas de *T. cruzi*. A: Cepa SC25 expressando proteína vermelha fluorescente; B: Cepa SC96 expressando proteína verde fluorescente. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus) utilizando objetiva de 100X, filtros para rodamina (A) e FITC(B).....52

**Figura 5:** Comparação entre parasitos transfectados expostos a diferentes concentrações de Geneticin (G418). Imagens resultantes da análise por citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o perfil de parasitos não transfectados (preto) e parasitos expressando RFP (vermelho). Parasitos transfectados expostos à concentração de 500 µg/ml de G418 (A); 750 µg/ml (B); 1000 µg/ml (C) e parasitos cultivados na ausência da droga (D). PerCP – filtro para detecção de emissão em 488 nm.....54

**Figura 6:** Histograma dos parasitos da cepa SC96GFP. Imagem resultante da análise por citometria de fluxo no aparelho FACSCanto II. O histograma mostra o perfil de parasitos expressando GFP (verde) em relação aos parasitos não transfectados (preto). Filtro para FITC.....55

**Figura 7:** Comparação entre parasitos transfectados cultivados na presença ou ausência de Geneticin (G418). Imagens resultantes da análise por citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o perfil de parasitos não transfectados (preto) e parasitos expressando GFP (verde), ambos da cepa SC96. Parasitos transfectados expostos à concentração de 1 mg/ml de G418 (A) e parasitos transfectados cultivados na ausência da droga (B). Filtro para FITC.....56

**Figura 8:** Análise comparativa de crescimento das cepas transfectadas de *Trypanosoma cruzi* em relação às cepas parentais. A: Curvas de crescimento das cepas SC25 e SC25RFP; B: Curvas de crescimento das cepas SC96 e SC96GFP. O número inicial de parasitos foi de  $4 \times 10^6$  parasitos/ml. Os dados representam a média de três replicatas biológicas e desvio padrão de contagens diárias para cada uma das cepas.....57

**Figura 9:** Células Vero infectadas com parasitos da cepa SC25RFP coradas com DAPI. A figura A representa formas amastigotas de *T. cruzi* expressando proteína fluorescente (RFP); B representa células Vero e parasitos corados com DAPI e C representa a sobreposição das imagens A e B. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus), utilizando objetiva de 100X.....58

**Figura 10:** Células THP-1 infectadas com parasitos fluorescentes da cepa SC96GFP. A figura A representa células THP-1 infectadas com parasitos da cepa SC-96GFP visualizadas em campo claro; B representa formas amastigotas de *T. cruzi* expressando proteína fluorescente visualizadas utilizando filtro para FITC; C representa a sobreposição das imagens de campo claro e de fluorescência. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus) utilizando objetiva de 40X.....59

**Figura 11:** Infecção de camundongos BALB/c com tripomatigotas fluorescentes da cepa SC25RFP provenientes de cultura de células Vero. Em (A) imagem de tripomastigota sanguíneo expressando RFP obtida em microscópio de fluorescência Olympus, com objetiva de 100x, utilizando filtro para rodamina, e

sobreposta com imagem em luz transmitida  
(B).....60

**Figura 12:** Dot plot dos parasitos das cepas SC25RFP e SC96GFP. Imagem resultante da análise por citometria de fluxo no aparelho Facs Canto II. O dot plot representa os perfis de quantidades semelhantes de parasitos expressando RFP e GFP. Filtros para FITC e PerCP.....60

**Figura 13:** Análise de crescimento *in vitro* das cepas transfectantes de *T. cruzi* em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada cepa. A: Co-cultivo dos parasitos das cepas SC25RFP e SC96GFP e B: Co-cultivo dos parasitos das cepas SC25RFP e YGFP. Os dados representam a média de três replicatas biológicas e desvio padrão de análises de citometria de fluxo realizadas em dias alternados no aparelho FACSCanto II. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0005$  utilizando teste t de *Student* para comparações das porcentagens obtidas no primeiro e último dia de co-cultivo para todas as proporções avaliadas.....62

**Figura 14:** Representação gráfica do percentual de células THP-1 infectadas com as cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções nos tempos 24 e 72 horas após a infecção (A) e a proporção de parasitos TcI e TcII encontrados nas misturas (B). Os resultados representam média e desvio padrão de contagens em triplicata. Utilizado o teste estatístico Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferoni \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .....64

**Figura 15:** Representação gráfica do número total de amastigotas presentes em células THP-1 infectadas com as cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções nos tempos 24 e 72 horas após a infecção. Os resultados representam média e desvio padrão de contagens em triplicata. Utilizado teste estatístico Two-way ANOVA seguido de teste “post-hoc” de Bonferoni \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .....65

**Figura16:** Ensaio de infecção de células THP-1 com as cepas transfectantes TcI e TcII. Células e parasitos corados com

giemsa em diferentes tempos de infecção. Células infectadas com parasitos da cepa TcI (A) e cepa TcII (C) 24 horas após infecção. Células infectadas com parasitos da cepa TcI (B) e cepa TcII (D) 72 horas após infecção. As barras pretas correspondem a 20 µm.....66

**Figura 17:** Ensaio de infecção de células THP-1 com as misturas das cepas transfectantes de *T. cruzi* em diferentes tempos de infecção. A: 24 horas após a infecção. B: 72 horas após a infecção. Utilizados filtros rodamina e FITC para visualização de parasitos RFP e GFP respectivamente. As barras brancas correspondem a 20 µm.....67

**Figura 18:** PCR em tempo real para quantificação dos genes GFP e RFP presentes nos tecidos de triatomíneos e animais infectados com cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções. Curvas de dissociação do DNA amplificado de GFP com pico em torno de 79°C (A) e de RFP com pico em torno de 85,5°C (D). Curvas de amplificação de GFP (B) e RFP (E) demonstrando amplificação nas diluições seriadas do DNA proveniente do plasmídeo pROCKGFPNeo e pTREXRFPNeo respectivamente. Curvas padrão geradas a partir da região linear de cada curva de amplificação de GFP (C) e RFP (F).....69

**Figura 19:** Representação gráfica do número de parasitos detectados por qPCR em 100 ng de DNA de triatomíneos experimentalmente infectados com as cepas transfectantes TcI e TcII de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções. A: Valores totais de parasitos detectados nas misturas. B: Número de parasitos TcI (representados pela cor vermelha) e parasitos TcII (representados pela cor verde). Utilizado teste *t* para comparações entre os grupos (\* $p < 0,05$ ).....70

**Figura 20:** Percentual de parasitos transfectantes TcI e TcII detectados pela qPCR em amostras de intestino e ampola retal de *T. tibiamaculata* experimentalmente infectados com *T. cruzi* após 45 dias de infecção. Teste two-way ANOVA realizado comparando as proporções do inóculo inicial e de valores obtidos após 45 dias de infecção. \*\*\* ( $p < 0,0005$ ), \*\* ( $p < 0,005$ ).....74

**Figura 21:** Curva de parasitemia média em camundongos BALB/c inoculados por via oral. Os valores correspondem a média e desvio padrão da parasitemia de 6 animais por grupo, inoculados com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas das cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas.....72

**Figura 22:** Percentual de sobrevivência em camundongos BALB/c infectados com as cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções.....73

**Figura 23:** Representação gráfica do número máximo de parasitos TcII (GFP) detectados pela qPCR em tecidos de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* nas diferentes proporções e tempos de infecção. As siglas representam os órgãos analisados: CO: coração, ES: estômago, FG: fígado, BA: baço, DU: duodeno, ME: músculo esquelético e RE: reto. Círculos coloridos representam a quantidade de parasitos/100 ng de DNA.....76

**Figura 24:** Ensaio de infecção de células Vero com parasitos transfectantes das cepas TcI e TcII tratados com pepsina. A: percentual de células infectadas com parasitos TcI e TcII. B: BSA em SDS-PAGE corado com Comassie Blue utilizado como controle da atividade da enzima pepsina. \*  $p < 0,05$  Two-way ANOVA.....77

**Figura 25:** Análises histopatológicas de secções de tecido cardíaco corados por HE de animais inoculados com as cepas transfectantes e suas misturas. A: Intensidade do processo inflamatório nas fases aguda e crônica e parasitismo tecidual na fase aguda (0- ausente, 1-discreto, 2- moderado e 3- intenso) presentes nas cepas transfectantes e suas misturas. Imagens representativas de tecido cardíaco de animal não infectado (B), tecido cardíaco de animais infectados com 50% de parasitos TcI e TcII (C) e tecido cardíaco de animais infectados com 100% de parasitos TcII (D). As setas indicam ninhos de amastigotas.....79

**Figura 26:** Análises histopatológicas de secções de estômago coradas por HE de animais inoculados com as cepas transfectantes e suas misturas. A: Intensidade do processo



inflamatório nas fases aguda e crônica (0- ausente, 1-discreto, 2-moderado e 3- intenso), presentes nas cepas transfectantes e suas misturas. Imagens representativas de estômago de animal não infectado (B) e estômago de animal inoculado com 90% de TcI e 10% de TcII (C).....80

**Figura 27:** Análises histopatológicas de secções de fígado coradas por HE de animais inoculados com as cepas transfectantes e suas misturas. A: Intensidade do processo inflamatório nas fases aguda e crônica (0- ausente, 1-discreto, 2-moderado e 3- intenso) presentes nas cepas transfectantes e suas misturas. Imagens representativas de tecido hepático de animal não infectado (B) e tecido hepático de animal inoculado com 10%TcI e 90% TcII (C).....81

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Nomenclatura para as divisões de *Trypanosoma cruzi* conforme o consenso de 2009.....26

**Tabela 2:** Tempo de duplicação in vitro das cepas transfectadas de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções em células da linhagem THP-1.....65

**Tabela 3** – Representação esquemática dos resultados da detecção de *Trypanosoma cruzi* por PCR utilizando os iniciadores S35 e S36 em amostras de tecidos de camundongos BALB/c inoculados com cepas transfectadas TcI e TcII e suas misturas. X representa amostras positivas para *T. cruzi*.....74

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
1.2 Diversidade genética do <i>T. cruzi</i> .....	25
1.3 Doença de Chagas.....	27
1.3.1 Doença de Chagas transmitida por via oral.....	30
1.4 Mecanismos moleculares da infecção por via oral pelo <i>T. cruzi</i> .....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
4.1 Parasitos.....	41
4.2 Plasmídeos vetores.....	41
4.3 Transformação de células cálcio competentes.....	42
4.4 Obtenção e restrição do DNA plasmidial.....	42
4.5 Transfecção das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	43
4.6 Seleção de parasitos transfectados.....	43
4.7 Citometria de fluxo.....	44
4.8 Ensaios de co-cultura.....	44
4.9 Células.....	44
4.9.1 Infecção de culturas de células Vero com <i>T. cruzi</i> .....	44
4.9.2 Infecção de células THP-1 com <i>T. cruzi</i> .....	45
4.10 Infecção em <i>Triatoma tibiamaculata</i> .....	46
4.11 Camundongos.....	47
4.11.1 Infecção de camundongos BALB/c por via oral com as cepas transfectadas de <i>T. cruzi</i> e suas misturas.....	47
4.11.2 Avaliação histopatológica de camundongos infectados com as cepas transfectadas de <i>T. cruzi</i> e suas misturas.....	48
4.12 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	48

4.13 Ensaio de infecção em células Vero de parasitos transfectados tratados com pepsina.....	49
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 Caracterização genética das cepas de <i>T. cruzi</i> .....	51
5.2 Transfecção integrativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e seleção de parasitos fluorescentes.....	52
5.3 Expressão de proteínas fluorescentes nos diferentes estágios de vida do parasito.....	56
5.3.1 Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> das cepas transfectadas em cultivo axênico.....	56
5.3.2 Infecção celular com cepas transfectantes de <i>T. cruzi</i> ....	57
5.3.3 Infecção de camundongos BALB/c com a cepa SC25RFP.....	59
5.4 Avaliação da interação <i>in vitro</i> de cepas TcI e TcII em ensaios de co-cultura.....	60
5.4.1 Avaliação do crescimento de parasitos transfectados em co-cultivo em meio axênico.....	60
5.5 Avaliação da dinâmica da infecção das cepas transfectadas e suas misturas em <i>Triatoma tibiamaiculata</i> .....	67
5.6 Avaliação da dinâmica da infecção por via oral das cepas transfectadas e suas misturas em camundongos BALB/c.....	71
5.6.2 Análise histopatológica dos tecidos de camundongos BALB/c inoculados com as cepas transfectadas e suas misturas.....	78
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO

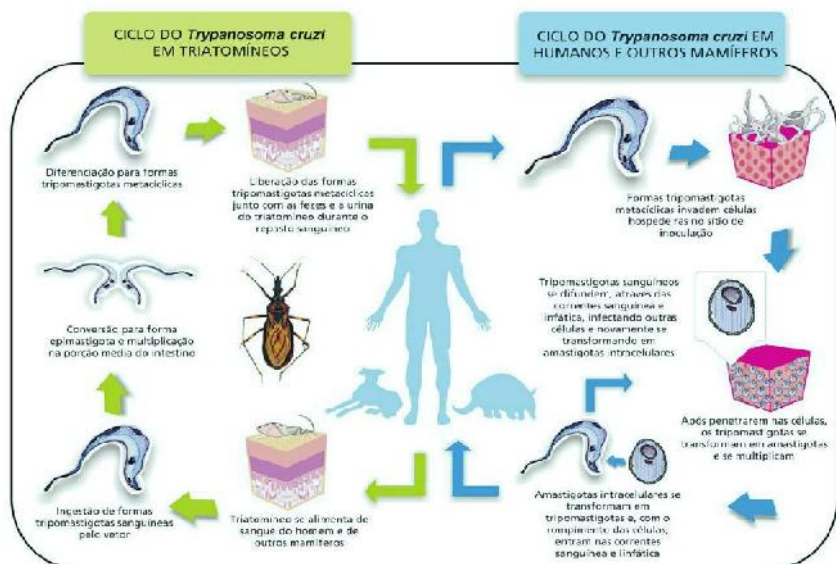
### 1.1 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) é um protozoário hemoflagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e a família Tripanosomatidae, amplamente disperso no continente americano, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. Diversos trabalhos demonstraram que o *T. cruzi* apresenta-se como uma espécie heterogênea, constituída por vários genótipos que circulam, tanto no ambiente doméstico como no silvestre, além de manter um íntimo contato com os seres humanos, animais reservatórios e vetores (ZINGALES et al., 1998; MACEDO E PENA, 1998; MACEDO et al., 2000; MILES et al., 2009; YEO et al., 2011).

O ciclo biológico do *T. cruzi* envolve a participação de hemípteros hematófagos da subfamília Triatominae (triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros) e várias espécies de mamíferos, incluindo o homem. O desenvolvimento do parasito no triatomíneo se inicia com a ingestão de tripomastigotas sanguíneos durante o repasto sanguíneo. No trato digestório do inseto, os tripomastigotas se diferenciam para epimastigotas os quais passam a se multiplicar por divisão binária e colonizam o tubo digestivo. Ao atingirem a porção posterior do intestino e especialmente a ampola retal, os epimastigotas que ficam aderidos ao epitélio intestinal se transformam em tripomastigotas metacíclicos (formas infectantes) os quais permanecem livres e são eliminados para o meio externo juntamente com as fezes e urina do inseto. A infecção no hospedeiro mamífero pode ocorrer através de diferentes mecanismos (como a contaminação de mucosas ou pele, ou pela ingestão). Uma vez no interior do hospedeiro as formas tripomastigotas penetram no interior de células, especialmente macrófagos e células musculares, onde se transformam em amastigotas e passam a multiplicar-se por divisão binária no citoplasma celular. Após um período de aproximadamente 96 a 120 horas os parasitos sofrem um processo de alongamento diferenciando-se para tripomastigotas. Estes parasitos apresentam elevada motilidade, rompem a célula

e são liberados no meio extracelular de onde poderão atingir a corrente sanguínea e/ou infectar novas células (Figura 1) (BRENER, 1973; BRENER, 1997).

Dois diferentes ecossistemas são descritos para o *T. cruzi*: um relacionado com triatomíneos silvestres e geralmente envolvendo mamíferos que convivem neste ambiente (ciclo silvestre) e outro dependente de triatomíneos domiciliados, envolvendo primariamente humanos e animais domésticos (ciclo doméstico). A conexão entre os dois ciclos é feita por mamíferos e/ou triatomíneos infectados que apresentam comportamento sinantrópico. O homem é um reservatório muito mais recente de *T. cruzi* e acredita-se que o primeiro contato entre as duas espécies remonta ao final do Pleistoceno, 15.000-20.000 anos atrás, quando os primeiros humanos povoaram o Continente Americano. Neste sentido, tem sido evidenciada a presença do DNA do parasito em múmias de 9.000 anos provenientes do norte do Chile e sul do Peru (AUFDERHEIDE et al., 2004).



**Figura 1:** Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

## 1.2 Diversidade genética do *T. cruzi*

O *T. cruzi* é considerado uma espécie heterogênea, consistindo de várias subpopulações, que apresentam cepas distribuídas em hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens além de insetos vetores (ZINGALES et al., 1998). Na prática, qualquer isolado obtido de uma infecção natural e mantido em laboratório é considerado uma cepa. Por sua vez uma cepa pode ser constituída por uma ou mais populações clonais com características diferentes (MACEDO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1998; 1999).

Para evidenciar essa alta variabilidade genética apresentada pelo parasito, foram empregadas técnicas bioquímicas e moleculares, como análises de isoenzimas (MILES et al., 1977, 1978, 1980; ROMANHA, 1982), kDNA-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplast DNA*) (MOREL et al., 1980), LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer*) (VAGO et al., 1996) e RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (STEINDEL et al., 1993).

No final da década de 1970 Miles e colaboradores analisaram o polimorfismo dos perfis eletroforéticos de seis enzimas e sugeriram uma classificação em três grupos distintos, os quais foram denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (MILES et al., 1977, 1978, 1980). Romanha (1982) analisando o perfil isoenzimático de amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos, verificou a presença de 4 zimodemas distintos, denominados ZA, ZB, ZC e ZD. A comparação dos zimodemas descritos por Romanha (1982), com aqueles descritos por Miles e colaboradores (1977; 1978), mostrou grande similaridade entre os zimodemas ZA e Z2, no entanto, os demais zimodemas foram distintos entre si. Dessa forma, admite-se que no Brasil, o *T. cruzi* esteja distribuído em pelo menos seis grupos isoenzimáticos principais: Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD.

Mais tarde, a divisão das cepas de *T. cruzi* nos grupos 1 e 2 foi realizada através da amplificação de uma região intergênica do mini-éxon, permitindo verificar a existência de uma correlação com o dimorfismo do gene de rRNA 24S alfa, que é diferente entre as cepas de *T. cruzi* provenientes de diferentes hospedeiros, vertebrados e invertebrados (MACEDO et al., 1992; SOUTO e ZINGALES, 1993; SOUTO et al., 1996; ZINGALES et al., 1998; MACEDO et al., 2004).

Numa tentativa de homogeneizar a nomenclatura, o grupo 1 foi renomeado linhagem *T. cruzi* II (ciclo doméstico), enquanto o grupo 2 foi designado linhagem *T. cruzi* I (ciclo silvestre) (ANONYMOUS, 1999). Entretanto, observou-se que algumas cepas não se enquadravam completamente em nenhuma destas duas linhagens principais, o que sugeria a existência de um terceiro grupo (SOUTO et al., 1996). Em 2000, Brisse e colaboradores propuseram a subdivisão da linhagem *T. cruzi* II em sublinhagens IIa, IIb, IIc, IId e IId.

Freitas e colaboradores (2006) estudaram o gene *MSH2* reforçando a probabilidade de existirem então três linhagens distintas do parasita, classificadas como *T. cruzi* I, II e III. Porém em 2009, durante uma reunião entre especialistas, chegou-se a um consenso de que as cepas de *T. cruzi* devem ser classificadas em seis *discrete typing units* (DTU), denominadas de TcI a TcVI (tabela 1) (ZINGALES et al., 2009).

**Tabela 1.** Nomenclatura para as divisões de *Trypanosoma cruzi* conforme o consenso de 2009.

DTU	Abreviatura	Equivalência
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I <sup>a</sup> e DTU I <sup>b</sup>
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II <sup>a</sup> e DTU IIb <sup>b</sup>
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT <sup>c</sup> , Z3-A <sup>d</sup> , DTU IIc <sup>b</sup> e <i>T. cruzi</i> III <sup>e</sup>
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 <sup>c</sup> , Z3-B <sup>d</sup> e DTU IIa <sup>b</sup>
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Z2 Boliviano <sup>c</sup> , rDNA 1/2 <sup>f</sup> , clonet 39 <sup>g</sup> e DTU IId <sup>b</sup>
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Z2 Paraguaio <sup>h</sup> e DTU IIe <sup>b</sup>

a: Anonymous (ANONYMOUS, 1999); b: Brisse et al. (BRISSE et al., 2000); c: Miles et al. (MILES et al., 1981); d: Mendonça et al. (MENDONÇA et al., 2002); e: Freitas et al. (FREITAS et al., 2006); f:



Souto et al. (SOUTO et al., 1996); *g*: Tibayrenc e Ayala (TIBAYRENC e AYALA, 1988); *h*: Chapman et al. (CHAPMAN et al., 1984). Adaptado de Zingales et al. (ZINGALES et al., 2009).

Em virtude da diversidade genética e epidemiológica, algumas publicações têm sugerido uma subdivisão da DTU TcI em quatro subgrupos (HERREIRA et al., 2007; FALLA et al., 2009; MONTEIRO et al., 2012), não estando esta inclusa na classificação atual das DTU.

### 1.3 Doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). A Organização Mundial de Saúde estima em sete milhões o número de pessoas infectadas e que 25 milhões vivam em áreas de risco de transmissão (WHO, 2016). A estimativa de óbitos anuais devido à doença de Chagas é de 14 mil e estudos econômicos calculam o custo global da doença em torno de 7,2 milhões de dólares por ano (LEE et al, 2013). Durante décadas a doença de Chagas foi considerada uma moléstia endêmica de países pobres, abrangendo principalmente, a América Central e do Sul, sendo basicamente uma patologia confinada a áreas rurais, não constituindo, assim, um problema de saúde pública nas demais áreas do mundo (KIRCHHOFF, 2011). Entretanto, em decorrência da emigração, nas últimas décadas, de latino-americanos portadores do *T. cruzi* para países europeus, asiáticos e especialmente para os Estados Unidos da América, a doença de Chagas passou a ser considerada um problema de saúde global. Em países não endêmicos a infecção pode ser propagada verticalmente, por transfusão sanguínea ou por transplantes de órgãos (SCHMUÑIS, 2007, GASCON et al., 2010; BASILE et al., 2011; PEREZ-AYALA et al., 2011; SALVADOR et al., 2014).

Cerca de 30% da população infectada desenvolve manifestações clínicas da doença, o que torna a patologia relevante em termos de saúde pública e impacto econômico (BRENER et al., 2000, PRATA, 2001; RASSI et al., 2010).

Os mecanismos de transmissão da infecção chagásica podem ser divididos em dois grupos: 1) os mecanismos principais: por meio de vetores, transfusão sanguínea,

transmissão oral e transmissão vertical; e 2) mecanismos secundários: em acidentes de laboratório, contato com animais infectados, transplante de órgãos e transmissão sexual (DIAS E COURA, 1997; COURA, 2007).

A transmissão vetorial é a via mais importante para o homem e ocorre por contaminação com fezes ou urina de triatomíneos. O êxito desta via de transmissão depende da frequência com que os triatomíneos defecam e se isso ocorre ou não durante ou seguido a hematofagia. Embora mais de 100 espécies de triatomíneos sejam considerados vetores potenciais de *T. cruzi*, cerca de 20 espécies apresentam importância epidemiológica devido a sua capacidade de colonizar domicílios humanos (SILVEIRA, 2000). No Brasil, cinco espécies têm importância epidemiológica particular por seu comportamento domiciliar: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*. As demais espécies são silvestres e mantêm um ciclo natural envolvendo mamíferos silvestres (DIAS E COURA, 1997; DIAS E MACEDO, 2005; SCHMUÑIS, 2007; GALVÃO E JUSTI, 2015)

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda corresponde ao período inicial da infecção pelo *T. cruzi* em humanos e em vários mamíferos, podendo apresentar-se aparente ou inaparente. Nesta fase, a parasitemia com duração geralmente efêmera no ser humano (entre três e oito semanas), é detectável por exames parasitológicos diretos do sangue ou por sorologia convencional (ELISA, RIFI ou testes Imunocromatográficos) (DIAS, 1984; AMATO-NETO et al., 1997; LUQUETTI E RASSI, 2000). Contudo, a maioria dos pacientes na fase aguda é assintomática e, portanto, não diagnosticada nem clínica nem laboratorialmente.

Na fase crônica, cerca de 70% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* se encontram na chamada forma assintomática ou indeterminada, que se caracteriza pela presença de anticorpos específicos e ausência de sintomas clínicos da doença. No entanto, 30% dos indivíduos cronicamente infectados desenvolvem complicações cardíacas ou digestivas anos ou décadas após a infecção inicial, num estágio da doença em que o parasitismo sanguíneo e tecidual é escasso. Cerca de 20 a 30% dos pacientes na fase crônica desenvolvem a forma cardíaca, que pode levar à insuficiência cardíaca ou morte súbita

em 70% e 30%, respectivamente. Aproximadamente 8 a 10% dos pacientes desenvolvem manifestações digestivas caracterizadas por dilatação patológicas de gravidade variável do esôfago e cólon, frequentemente associadas com as manifestações cardíacas (PRATA, 2001; RASSI et al., 2010). Essa fase é caracterizada por níveis parasitêmicos circulantes abaixo da capacidade de detecção por meio de exames parasitológicos convencionais, sendo a infecção comprovada por métodos sorológicos e/ou moleculares (LUQUETTI E RASSI, 2000).

Atualmente, no Brasil, há a predominância de casos crônicos da doença de Chagas, sendo em sua maioria devido a infecções passadas, de origem vetorial, relacionada à baixa condição econômica da população afetada (DIAS et al., 2008; COURA E DIAS, 2009; WHO, 2009). Nas últimas décadas, devido principalmente a mudanças na forma de transmissão da doença, pode-se observar, casos isolados ou surtos de doença de Chagas na forma aguda, nos estados da Amazônia Legal, Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A transmissão vetorial é responsável por mais de 70% dos casos em países onde não existe controle sistemático de vetores. Da mesma forma, a transmissão transfusional pode responder por mais de 20% dos casos em países sem hemovigilância, como na Bolívia, onde metade dos doadores de sangue está infectada com *T. cruzi* (COURA E ALBAJAR-VIÑAS, 2010).

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde. Embora a transmissão vetorial esteja controlada, existem várias evidências experimentais e observações de campo que demonstram a transmissão do *T. cruzi* ao homem e vários mamíferos pela via oral. Diferentes tipos de alimentos e veículos de carregamento do flagelado têm sido implicados nesta modalidade de transmissão, geralmente sendo os casos humanos relacionados com triatomíneos infectados nas imediações do evento (DIAS, 2006; STEINDEL et al., 2008; DE NOYA et al., 2010; DE NOYA et al., 2015). A infecção por via oral se tornou o mais importante e permanente mecanismo de transmissão da doença de Chagas

no Brasil, já que a transmissão vetorial e transfusional do *T. cruzi* foram controladas (COURA, 2006).

No ano de 2012 a doença de Chagas foi incluída na *London Declaration on NTDs*, iniciativa resultante da parceria de órgãos públicos e privados sob a chefia da Organização Mundial de Saúde (WHO). Essa iniciativa estabelece metas de controle, eliminação e erradicação de 10 doenças negligenciadas até o ano de 2020. Dentre as doenças listadas estão: filariose linfática, leishmaniose visceral, esquistossomoses, doença de Chagas, entre outras. (CORASSA et al., 2016).

Embora muitos centros de pesquisa ao redor do mundo se dediquem ao estudo da doença de Chagas, poucos avanços no controle da doença e na diminuição de novos casos têm sido alcançados. Em partes pela falta de recursos da maioria dos laboratórios de pesquisa e muito pela falta de aplicabilidade dos estudos realizados (TARLETON, 2016).

### **1.3.1 Doença de Chagas transmitida por via oral**

A infecção adquirida por via oral não é um quadro epidemiológico recente na doença de Chagas. A transmissão de *T. cruzi* no ciclo enzoótico ocorre, principalmente, por via oral entre mamíferos que se alimentam ocasionalmente de triatomíneos infectados que, por sua vez, se alimentam do sangue desses animais. No trabalho original de Chagas (1909) a infecção de saguis *Callitrix penicillata* com triatomíneos infectados com *T. cruzi* foi atribuída à ingestão dos insetos. Ainda no ciclo natural, a predação entre mamíferos deve colaborar para a transmissão do parasito. Um mecanismo alternativo de transmissão para outros animais e para humanos é a ingestão de carne de caça crua ou mal cozida (AMUNARRIZ et al., 1991; AGUILAR E YÉPEZ, 1995; VALENTE et al., 1999; 2009; ROQUE et al., 2008).

Os primeiros registros oficiais sobre a transmissão experimental de *T. cruzi* pela via oral foram realizados na Argentina por Natan-Larrier (1921), Brumpt (1931), Kofoed e Donat (1933) e Cardoso (1933) em mamíferos que se contaminaram após a ingestão de fezes de triatomíneos infectados. Posteriormente, outros autores discutiram a possibilidade de contaminação acidental de alimentos com *T. cruzi* (VERGANI, 1952; DIAZ UNGRÍA, 1968). Mayer (1961) e

Díaz Ungría (1964; 1967) observaram que experimentalmente, animais podem se infectar com *T. cruzi* através da ingestão de alimentos contaminados. Vários estudos relatam a transmissão deste parasito pela via oral à diferentes hospedeiros através da ingestão de diversas espécies de vetores (RICKMANN, 1966; DIAZ UNGRÍA, 1969; DIAZ UNGRÍA E SOTO BRACHO, 1970; DIAZ UNGRÍA E ZEUS 1971; DAVIS, RUSSEL E ADAMS 1980, LAINSON et al., 1980). Roellig e colaboradores (2009) relataram que a via de transmissão mais ativa do *T. cruzi* no ambiente silvestre nos Estados Unidos é a ingestão de triatomíneos infectados, por guaxinins e gambás.

A partir do surgimento de novos surtos de doença de Chagas aguda adquirida por via oral, diversos estudos passaram a utilizar o modelo murino na tentativa de elucidar a dinâmica dessa via de infecção. Estudos experimentais demonstraram que o curso da infecção oral difere da infecção clássica (intraperitoneal) e que ainda pode ser influenciada pela cepa do parasito (CAMANDAROBÁ et al., 2002; CORTEZ et al., 2006; DIAS et al, 2013; MAEDA et al, 2016). Outros autores revelaram alterações no perfil de citocinas de ratos infectados por via oral com relação à animais infectados por via intraperitoneal (KUEHN et al., 2014), no entanto, a resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *T. cruzi* é um fenômeno intrínseco que depende da cepa do parasito, do órgão infectado e do tempo de infecção (RODRIGUES et al., 2016).

Os primeiros casos de infecção humana pela via oral foram registrados na Argentina quando Mazza (1936) descreveu a infecção por *T. cruzi* após a ingestão de leite materno contaminado. Diversos episódios de doença de Chagas aguda foram relatados no Chaco argentino, na Amazônia equatoriana e em várias regiões da Colômbia, todos associados a ingestão de carne crua ou mal cozida de animais silvestres (MAZZA E SCHURMAN, 1930; MAZZA et al. 1931; CARPINTERO, 1978; AMUNARRIZ et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 1992; AGUILAR E YÉPEZ, 1995). Na Venezuela em 2007 ocorreu um surto com 103 casos em uma escola na periferia de Caracas, sendo 44 confirmados parasitologicamente. O surto foi atribuído a ingestão de suco de goiaba contaminado com *T. cruzi* (DE NOYA et al., 2010). Após esse evento mais dez surtos de doença de Chagas aguda foram relatados na Venezuela, com 249 casos e 4 mortes (DE NOYA et al., 2015). Na Colômbia foram registrados 6 surtos

de doença de Chagas aguda transmitida por via oral no período de 1992 à 2010. Estudos de caracterização genética utilizando MLMT (Multilocus Microsatellite Typing) e mtMLST (mitochondrial Multilocus Sequence Typing) em amostras de isolados de pacientes, mostrou o envolvimento de parasitos dos genótipos TcI e TcIV em surtos orais nesse país (RAMIREZ et al., 2013).

A primeira descrição deste tipo de transmissão ao homem no Brasil ocorreu no Rio Grande do Sul e foi atribuída, entre outras fontes, a alimentos contaminados pela urina de gambá (NERY-GUIMARÃES et al., 1968). Desde então, surtos simultâneos de doença de Chagas atribuídos a infecção oral foram registrados em diferentes regiões do Brasil. Na região Nordeste ocorreram surtos nas cidades de Catolé da Rocha, na Paraíba (SHIKANAI-YASUDA, 1991), Macaúbas na Bahia (DIAS et al., 2008) e Redenção no Ceará (ROQUE et al., 2008). Mesmo naquelas regiões anteriormente consideradas não endêmicas para a doença de Chagas, como Navegantes em Santa Catarina (STEINDEL et al., 2008), e na Região Amazônica nos estados do Pará, Amapá e Maranhão (PINTO et al., 2008; MONTEIRO et al., 2012), foram relatados diversos casos sempre associados a formas agudas graves da doença e mortes humanas. Nos surtos do Norte e Nordeste do Brasil os alimentos envolvidos foram suco de frutas regionais como açaí e macaba e na região Sul, o caldo de cana de açúcar, todos contaminados com *T. cruzi*.

De acordo com o Ministério da Saúde (2015) no período de 2000 a 2013 foram notificados 1.570 casos agudos da doença de Chagas no Brasil, sendo 1.081 casos associados à transmissão oral. Os estados brasileiros que registraram maior número de casos foram o Pará, o Amazonas e Amapá, todos na Região Amazônica onde predomina a forma de transmissão oral. Neste mesmo período, foram registrados 16 óbitos por doença de Chagas aguda no Brasil.

O aumento no número de surtos orais de doença de Chagas aguda reportados no Brasil nos últimos anos pode ser atribuído a um melhor diagnóstico e reconhecimento da doença através de vigilância ativa, bem como a falta de boas práticas de higiene no preparo dos alimentos e mudanças no ambiente silvestre, aproximando os ecótopos dos vetores e reservatórios das casas (SHIKANAI-YASUDA E CARVALHO, 2015). Durante esses surtos é necessário que o tratamento aos doentes seja feito imediatamente para prevenir a transmissão da doença e que

seja realizado um detalhado levantamento epidemiológico na área indicando a possibilidade do aparecimento de novos casos e apontando os vetores e reservatórios envolvidos (DIAS et al., 2015).

No surto da doença aguda em Santa Catarina em 2005, após confirmação laboratorial, constatou-se que 24 pessoas foram infectadas pelo *T. cruzi*. Todos os indivíduos determinados positivos relataram consumo de caldo de cana que foi associado à provável moagem de triatomíneos durante a preparação do caldo de cana. Três pacientes evoluíram para óbito sem diagnóstico e a infecção pelo *T. cruzi* pós-morte foi comprovada em dois casos. Os isolados de *T. cruzi* obtidos através de hemocultura dos pacientes infectados foram inicialmente genotipados como TcII (STEINDEL et al., 2008). No entanto, utilizando-se novos marcadores moleculares observou-se a presença dos genótipos TcII e TcIV em amostras isoladas destes pacientes em fase aguda da doença (ANDRADE et al., 2011).

Até o presente, apenas os genótipos TcV e TcVI de *T. cruzi* não foram encontradas em casos humanos associados aos surtos de transmissão oral no Brasil, predominando TcI e TcIV nos estados do Norte e TcII na região Sul do Brasil (STEINDEL et al., 2008; MARCILI et al., 2009; VALENTE et al., 2009; ANDRADE et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011).

Apesar dos avanços na contenção da expansão da doença de Chagas no Brasil, medidas de controle de focos naturais e residuais de triatomíneos, bem como o controle da domiciliação de novos vetores e a promoção de práticas de higiene na prevenção da transmissão oral devem ser tomadas (CORASSA et al., 2016).

#### **1.4 Mecanismos moleculares da infecção por via oral pelo *T. cruzi***

Experimentos de infecção por via oral em camundongos mostraram que formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de invadir e se replicar no epitélio da mucosa gástrica, mas sem evidência de invasão da orofaringe ou do esôfago de animais. A mucosa gástrica parece ser a única via de entrada do *T. cruzi* para a infecção sistêmica quando o parasito é ingerido (HOFT et

al., 1996). Tripomastigotas possuem glicoproteínas de superfície que os protegem da degradação pelo suco gástrico mantendo sua infectividade mesmo no ambiente ácido do estômago (MORTARA et al., 1992). Estudos posteriores mostraram que algumas cepas são capazes de se tornar ainda mais infectivas após o contato com o suco gástrico (CORTEZ et al., 2006; COVARRUBIAS et al., 2007).

Para invadir as células epiteliais gástricas, as formas tripomastigotas metacíclicas devem primeiramente se ligar à camada de mucina gástrica e depois atravessá-la. Várias moléculas de superfície do *T. cruzi* influenciam os mecanismos moleculares da infecção por via oral e em conjunto, são determinantes para a capacidade de invasão de células mamíferas por tripomastigotas metacíclicos das diversas cepas de *T. cruzi*.

A glicoproteína de superfície gp82 é um membro da superfamília das trans-sialidases, altamente expressa em formas tripomastigotas metacíclicas. Essa glicoproteína liga-se ao seu receptor na célula hospedeira e inicia uma cascata de sinalização que promove a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$ , necessária para a internalização do parasito (YOSHIDA et al., 2000). Na infecção por via oral, a gp82 é resistente à degradação por pepsina em pH ácido (CORTEZ et al., 2006). Sendo assim, essa sialidase tem papel na invasão das células epiteliais da mucosa gástrica, mediando a ligação à camada de mucina gástrica (NEIRA et al., 2003) e posterior ligação às células epiteliais que induz uma resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  bidirecional requerida para a invasão (RUIZ et al., 1998).

Algumas cepas de *T. cruzi* apresentam deficiência de gp82 e acabam por expressar uma glicoproteína de superfície de 30 kDa (gp30) que também é capaz de induzir a sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, a gp30 apresenta menos afinidade à mucina gástrica que a gp82 resultando em níveis mais baixos de parasitemia em camundongos experimentalmente infectados com cepas deficientes de gp82 (CORTEZ et al., 2003; CORTEZ et al., 2012). Outra glicoproteína importante no processo de invasão celular é a gp90. Essa glicoproteína é abundantemente expressa em formas tripomastigotas metacíclicas agindo como modulador negativo na invasão celular (MALAGA E YOSHIDA, 2001). Para parasitos que expressam gp82 e gp90 em altos níveis, existem duas particularidades: 1) parasitos que



expressam gp90 suscetível à digestão por pepsina apresentam alta infectividade após a exposição ao suco gástrico ou 2) parasitos que expressam gp90 resistente à digestão por pepsina apresentam baixa capacidade infectiva (RUIZ et al., 1998). Formas tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas expressam ainda as mucinas gp35/50 que assim como as gp82, ligam-se às células alvo e provocam uma mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$ , contudo, menos intensa que a induzida por gp82 (YOSHIDA et al., 1989; RUIZ et al., 1998).

A severidade da doença de Chagas aguda reportada em pacientes infectados por via oral pode ter como causa a degradação da gp90 (regulador negativo da infecção) (YOSHIDA, 2009). Cepas isoladas de pacientes em fase aguda da doença infectados por via oral mostraram uma baixa capacidade de infecção celular *in vitro*, mas apresentam elevados níveis de parasitemia e mortalidade em camundongos experimentalmente infectados por via oral (COVARRUBIAS et al., 2007; TESTON et al., 2016).

A degradação da gp90 e por consequência o aumento da infecciosidade do *T. cruzi* na infecção oral, foram comprovados utilizando uma cepa isolada durante o surto de doença de Chagas aguda em Santa Catarina. Esse isolado apresenta altos níveis de expressão de gp90 detectados pelo anticorpo Mab5E7, no entanto, após passagem em estômago de camundongos o anticorpo não foi mais capaz de detectar essa glicoproteína, comprovando que alguns isolados se tornam mais virulentos em infecções orais (COVARRUBIAS et al., 2007).



## 2. JUSTIFICATIVA

Dezenas de surtos de doença de Chagas aguda têm sido reportados no Brasil, a maioria associados à transmissão oral. Essa via de transmissão da doença para humanos e outros mamíferos, foi demonstrada experimental, clínica e epidemiologicamente. No entanto, estudos sobre a dinâmica da infecção por via oral ainda são incipientes e diante da elevada variabilidade genética do parasito precisam ser mais investigados.

Apesar dos avanços na caracterização molecular do *T. cruzi*, pouco se sabe sobre os mecanismos que determinam as formas clínicas da doença de Chagas. No Brasil a grande maioria dos casos crônicos da doença está relacionada apenas com *T. cruzi* II, o que levanta a hipótese de seleção dessa linhagem genética do parasito durante a infecção humana (GOMES et al., 1998; MACEDO et al., 2004). Estudos sugerem que as características biológicas do parasito, como infecciosidade e capacidade de multiplicação, podem favorecer a seleção de parasitos pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* II e contribuir para a patogenicidade da doença (PENA et al., 2011). O estudo de caracterização das cepas de *T. cruzi* isoladas no surto de doença de Chagas aguda em Santa Catarina mostrou que vetores e reservatórios capturados em áreas próximas ao local do surto apresentaram co-infecção com *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, enquanto cepas isoladas de humanos na fase aguda apresentaram infecção apenas com *T. cruzi* II (STEINDEL et al., 2008). Utilizando as mesmas cepas, porém técnicas moleculares distintas, observou-se que uma cepa caracterizada apenas como *T. cruzi* II nesta nova abordagem mostrou uma mistura de populações pertencentes aos genótipos *T. cruzi* II e *T. cruzi* IV (ANDRADE et al, 2011). Neste sentido, a presença de um ou mais genótipos pode estar relacionada às diferentes manifestações clínicas da doença aguda em humanos observada durante esse surto (ANDRADE et al, 2011).

A avaliação *in vitro* da interação parasito-célula utilizando diferentes cepas de *T. cruzi* mostrou ausência de correlação entre as características biológicas de infectividade, parasitemia e mortalidade *in vivo* e as taxas de infecção e multiplicação intracelular em três diferentes linhagens celulares (TOMA et al., 2000). Estudos de co-infecção experimental em camundongos

com as cepas JG e CL Brener de *T. cruzi* mostraram que animais co-infectados apresentaram uma diminuição da inflamação e da gravidade da doença sugerindo algum mecanismo de modulação da resposta imunológica (RODRIGUES et al., 2010). A via oral de infecção presente nos surtos de doença de Chagas aguda ainda é pouco compreendida. Estudos experimentais indicam que animais inoculados por via intragástrica com diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* e de diferentes genótipos apresentam parasitemia mais tardia e mais discreta com relação aos animais inoculados por via intraperitoneal (CAMANDAROBA et al., 2002; DOMINGUES et al., 2016). O perfil de infecção mostrou diferenças em relação as taxas de infecciosidade e mortalidade e ao perfil histopatológico nos animais inoculados com tripomastigotas sanguíneos e metacíclicos (DIAS et al, 2013).

O modelo murino tem se mostrado uma importante ferramenta para melhor compreender a dinâmica da infecção pelo *T. cruzi*. Em camundongos, a doença de Chagas manifesta-se de forma semelhante à observada na infecção em humanos, sendo influenciada pelo background genético do animal e pela cepa infectante. Apesar de esse modelo ser amplamente utilizado na pesquisa com *T. cruzi*, os mecanismos de interação-parasito-hospedeiro ainda precisam ser mais bem elucidados.

Para isso, o estabelecimento de um modelo experimental murino reprodutível de infecção pela via oral, bem como a utilização de parasitos geneticamente modificados expressando proteínas fluorescentes de fácil detecção, podem ser valiosos no estudo da interação parasito-hospedeiro.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Desenvolver linhagens TcI e TcII de *Trypanosoma cruzi* expressando proteínas fluorescentes para estudo da interação parasito-hospedeiro

#### Objetivos Específicos:

- Transfectar as cepas TcI e TcII com plasmídeos integrativos contendo as sequências das proteínas RFP e GFP;
- Avaliar a expressão de proteínas fluorescentes nos diferentes estágios de vida do parasito;
- Avaliar o crescimento de cepas transfectadas em ensaios de co-cultura;
- Avaliar a dinâmica da infecção das cepas transfectadas TcI e TcII de *T. cruzi* e suas misturas em *Triatoma tibiamaculata*;
- Avaliar a dinâmica da infecção das cepas transfectadas TcI e TcII de *T. cruzi* e suas misturas em camundongos Balb/C;
- Detectar e estimar pela qPCR a carga parasitária tecidual em camundongos infectados com as cepas transfectadas TcI e TcII e suas misturas;
- Avaliar a distribuição tecidual das cepas TcI e TcII e suas misturas em diferentes órgãos através de histopatologia.



## 4. METODOLOGIA

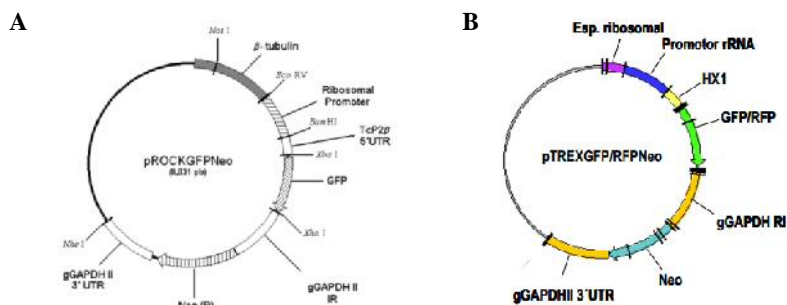
### 4.1 Parasitos

Para este estudo foram utilizadas a cepa SC25 de *T. cruzi*, isolada de *Didelphis marsupialis* (STEINDEL et al., 1995) e pertencente à DTU TcI e as cepas SC96, isolada em 2005 através da hemocultura de um paciente em fase aguda durante um surto de doença de Chagas por via oral em Santa Catarina (STEINDEL et al., 2008) e Y de *T. cruzi* também isolada de um paciente na fase aguda da doença (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953), ambas pertencentes à DTU TcII. Os parasitos foram mantidos a 27°C em meio LIT (*liver-infusion tryptose*), suplementado com 10% de soro bovino fetal através de repiques semanais. A fim de comprovar que as cepas pertenciam as DTUs correspondentes foi realizada a amplificação diferencial de um fragmento do espaçador não-transcrito do gene do mini-éxon segundo protocolo descrito por Souto e colaboradores (1996).

### 4.2 Plasmídeos vetores

Foram utilizados os vetores pROCKGFPNeo, pTREXGFPNeo e pTREXRFPNeo, gentilmente cedidos pela Dra. Santuza M. R. Teixeira da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O vetor pROCKGFPNeo descrito por DaRocha e colaboradores (2004) permite a integração de genes exógenos via recombinação homóloga com o loco de  $\beta$ -tubulina, um gene multicópia, o que facilita o evento de recombinação (figura 2A). Já os vetores de expressão pTREXGFPNeo e pTREXRFPNeo são derivados do vetor pTREX descrito por Vazques e Levin (1999). Eles contêm as seguintes sequências: espaçador ribossomal que é parte integrante do promotor de rRNA; promotor de RNA ribossômico que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter; HX1 que é um sinal altamente eficiente para processamento do mRNA por *trans-splicing*; gene codificador da proteína verde fluorescente de *Aquorea victoria* (GFP) ou a proteína vermelha fluorescente (RFP) de *Discosoma* spp; região intergênica e 3'UTR do gene de gGAPDH, que são sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do gene de Neomicina, respectivamente e região codificadora para a neomicina

fosfotransferase (NEOr) que confere resistência a neomicina e ao seu análogo G418 (figura 2B).



**Figura 2:** Esquema representativo dos vetores de expressão: (A) pROCKGFPNeo e (B) pTREXGFP/RFPNeo.

### 4.3 Transformação de células cálcio competentes

Alíquotas de bactérias *E. coli* (cepa DH5<sup>+</sup>), tratadas previamente com  $\text{CaCl}_2$  (SAMBROOK et al., 1989), foram misturadas com o plasmídeo, e então mantidas em banho de gelo por 30 minutos, transformadas por choque térmico a 42°C por 45 segundos e em seguida transferidas para banho de gelo por 2 minutos. A este material foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de meio SOC líquido (2% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl 1M, pH 7,0) sendo incubado por 1 hora a 37 °C sob agitação constante (100 rpm). Em seguida, toda a suspensão da cultura transformada foi plaqueada em meio LB (Luria Bertani) ágar (1,5%) suplementado com 100 $\mu\text{g}$  /mL de ampicilina.

### 4.4 Obtenção e restrição do DNA plasmidial

O DNA plasmidial dos clones considerados positivos foram preparados utilizando o “kit” PureYeld™ PlasmidMidiprep System (Promega), de acordo com instruções do fabricante. As amostras de DNA plasmidial obtidas foram dosadas em espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf) a 260 nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância a 260/280nm.

As digestões do DNA plasmidial foram realizadas nas proporções de uma unidade da enzima de restrição *NheI* (New



England, BioLabs) para cada 1 µg de DNA, na presença do tampão especificado pelo fabricante a 37°C *overnight*. Em seguida o DNA foi precipitado na presença de isopropanol 100% e centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos. Esse precipitado foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado por 5 minutos. Após secagem o precipitado de DNA foi solubilizado em água. Os produtos das digestões do DNA plasmidial foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1% em tampão TBE 1X (0,01M de Tris base, 0,09% de ácido bórico anidro, 0,1% de EDTA 0,5M pH 8,0), nos quais as amostras foram aplicadas na presença do tampão de amostra 2X (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 30% de glicerol). Após coloração por 0,5 µg/mL de brometo de etídeo os géis foram visualizados à luz ultravioleta e fotografados.

#### **4.5 Transfecção das formas epimastigotas de *T. cruzi***

Epimastigotas na fase exponencial de crescimento foram transfectados utilizando o aparelho *Nucleofector*® (Lonza, Basel), nas seguintes condições:  $5 \times 10^7$  parasitos cultivados em meio LIT foram centrifugados, lavados duas vezes com PBS e ressuspendidos em tampão de eletroporação (H<sub>2</sub>O contendo 0,5M NaPO<sub>4</sub>, 0,3M KCl, 0,5M Hepes e 50mM CaCl<sub>2</sub>). A essa suspensão de células foram adicionados 10µg de DNA plasmidial e o volume final de 100µl foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,4 centímetros (cm) de abertura. O programa U-33 do aparelho de transfecção foi selecionado e após pulso único, os parasitos foram transferidos para tubos contendo ágar-sangue e 2 ml de meio LIT e mantidos a 27°C.

#### **4.6 Seleção de parasitos transfectados**

Para a seleção dos parasitos transfectados foi utilizado o antibiótico G418 (Geneticin) (Sigma-Aldrich). Este composto é um aminoglicosídeo relacionado com a Gentamicina e é amplamente utilizado como agente seletivo. Por ser um análogo de sulfato de neomicina, ele interfere diretamente na síntese de proteínas em células eucarióticas. Após 24 horas da realização do processo de transfecção, as culturas foram acrescidas de G418 em uma concentração inicial de 250µg/ml.

## 4.7 Citometria de fluxo

Para a análise de *T. cruzi* por citometria de fluxo 200 µl da cultura dos parasitos transfectados foram lavados duas vezes com PBS e o sedimento celular foi suspenso em 500µl do mesmo tampão para a avaliação (50.000 eventos) em citômetro FACSCantoll (BD Biosciences). Os dados da citometria de fluxo foram analisados por tamanho (FSC) e complexidade (SSC) para a escolha da população. A identificação dos parasitos fluorescentes foi realizada em histograma utilizando os canais FITC e PerCP. Os dados obtidos foram analisados pelo programa Flowing® 2.5.1. (Turku).

## 4.8 Ensaios de co-cultura

Para os ensaios de co-cultura em meio axênico, misturas contendo um total de  $4 \times 10^6$  formas epimastigotas/ml foram cultivados em meio LIT nas seguintes proporções: 90% de parasitos TcI e 10% de parasitos TcII, 50% de ambas as cepas e 10% de TcI e 90% de TcII. As amostras foram submetidas à análise por citometria de fluxo utilizando os canais FITC para detecção de fluorescência verde e PerCP para detecção de parasitos expressando fluorescência vermelha. Os ensaios em triplicata foram realizados em dias alternados por um período de até treze dias e analisados no programa Flowing® 2.5.1. (Turku). O teste t de *Student* foi utilizado para a comparação dos percentuais de parasitos fluorescentes apresentados pelas cepas no primeiro e último dia do co-cultivo.

## 4.9 Células

### 4.9.1 Infecção de culturas de células Vero com *T. cruzi*

Células Vero foram cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) + 5% de soro bovino fetal (SBF) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por repiques semanais. As células foram infectadas com formas tripomastigotas provenientes de cultura axênica das cepas SC25RFP, SC96GFP e YGFP por um período de 12 horas em

meio DMEM. Após incubação as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção de parasitas não internalizados e novamente incubados em meio DMEM a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A partir de 72 horas após a infecção as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante foram coletadas e utilizadas nos ensaios de infecção de células da linhagem THP-1 e infecção de camundongos Balb/C.

#### 4.9.2 Infecção de células THP-1 com *T. cruzi*

As células THP-1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda – ATCC#TIB-202) foram cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI- 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* – HiMedia Laboratories) pH 7,4 suplementado com 10% SBF, 12,5 mM de Hepes (Gibco), 2 mM de Glutamax®, (Gibco), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco) e mantidas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram mantidas através de repiques semanais na densidade de  $3 \times 10^5$  células por ml em 12 ml. A identificação de células viáveis foi determinada com o uso do corante de viabilidade celular Azul de Trypan (0,02 %), quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas na concentração desejada em meio RPMI.

Células THP-1 coletadas no 4º dia de crescimento foram quantificadas e induzidas à diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos conforme descrito por Schwenden e colaboradores (1996). Em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis, foram cultivadas  $1,5 \times 10^5$  células/poço em meio RPMI completo acrescido de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 ng/ml a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72h. As células THP-1 diferenciadas foram infectadas com tripomastigotas oriundos de cultura celular (células VERO) das cepas SC25RFP e YGFP e de suas misturas na proporção de 5:1 parasito/célula. Após período de incubação de 4 horas as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção de parasitos não internalizados e novamente incubadas em meio RPMI completo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As culturas foram avaliadas em microscópio de fluorescência nos tempos: 24 e 72 horas após a infecção e a taxa de infecção foi determinada através do

percentual de células infectadas em 200 células contadas aleatoriamente. O tempo de duplicação das cepas TcI, TcII e de suas misturas foi determinado pelo website doubling-time.com utilizando a seguinte fórmula:

$$TD = \frac{(T1-T0)\text{Log}2}{\text{Log}(N1) - \text{Log}(N0)}$$

Onde:

TD = tempo de duplicação

T1 = tempo final de observação

T0 = tempo inicial de observação

N1 = número médio de parasitos por célula após 72 horas de interação

N0 = número médio de parasitos por célula após 24 horas de interação

#### 4.10 Infecção em *Triatoma tibiamaculata*

Os triatomíneos foram mantidos em insetário em condições de temperatura, umidade relativa e luz controladas, sendo alimentados em intervalos de 15 dias. Para estudos de interação parasito-vetor, grupos de 10 ninfas de 3º instar de *T. tibiamaculata* foram alimentadas artificialmente com as cepas transfectadas SC25RFP, YGFP e suas misturas em diferentes proporções.

Para a alimentação artificial cerca de 5 ml de sangue murino desfibrinado e inativado foram misturados a 3 ml de cultura contendo, aproximadamente,  $10^6$  formas epimastigotas. Essa suspensão foi colocada em alimentadores artificiais e a alimentação realizada conforme o descrito por Garcia e colaboradores (1989). Durante todo o experimento a temperatura dos alimentadores foi mantida constante em 37°C por meio da passagem de água aquecida, sendo o conteúdo dos alimentadores homogeneizado a cada 30 minutos para evitar a sedimentação dos parasitos. Ao término de 2 horas os alimentadores foram retirados e as ninfas mantidas em condições controladas, alimentadas quinzenalmente e o desenvolvimento dos parasitos foi monitorado através de microscopia convencional e de fluorescência.

Após 45 dias de infecção o intestino médio e ampola retal dos triatomíneos foram retirados para a realização de extração

de DNA através do método de fenol-clorofórmio. Foram realizados ensaios de PCR convencional para determinação da infecção e de PCR em tempo real (qPCR) para quantificar as proporções de parasitos TcI e TcII presentes nas amostras de intestino dos insetos.

#### **4.11 Camundongos**

Camundongos BALB/c oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) foram utilizados para ensaios de co-infecção por via oral. Todos os procedimentos foram realizados na observância dos preceitos estabelecidos pelo Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo PP00847/CEUA).

##### **4.11.1 Infecção de camundongos BALB/c por via oral com as cepas transfectadas de *T. cruzi* e suas misturas**

Grupos de 8 camundongos fêmeas da linhagem Balb/C com 5 a 6 semanas de idade foram infectados pela via oral por gavagem em um volume de 0,3 ml de caldo de cana contendo  $5 \times 10^5$  tripomastigotas das cepas transfectadas SC25 (TcI), YGFP (TcII) e de suas misturas nas seguintes proporções: TcI 90%/ TcII 10%, TcI 50%/ TcII 50% e TcI 10%/ TcII 90%. Os animais foram mantidos em biotério climatizado em ciclo claro/escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*.

A parasitemia sanguínea foi realizada em intervalos de dois dias a partir do 2º dia após a inoculação até o trigésimo dia pela técnica de Brener (1962) em microscópio de fluorescência. Foram determinados o período pré-patente, a duração da parasitemia e a mortalidade cumulativa. Os dados médios  $\pm$  desvio padrão da média de cada dia de contagem foram utilizados para determinação da curva de parasitemia. Os animais que não apresentaram parasitemia sanguínea detectável no exame de sangue a fresco foram submetidos à hemocultura e PCR para comprovação da infecção.

#### **4.11.2 Avaliação histopatológica de camundongos infectados com as cepas transfectadas de *T. cruzi* e suas misturas**

Dois animais infectados de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical 24 horas após a infecção (Tempo 1) e em seguida foram coletados o estômago, duodeno e reto para avaliação histopatológica. No 22º dia após a infecção (Tempo 2) foram sacrificados dois animais de cada grupo e no 45º dia após a infecção (Tempo 3) todos os animais sobreviventes foram sacrificados. Foram coletados os seguintes órgãos dos animais eutanasiados nos tempos 2 e 3: estômago, duodeno, reto, coração, músculo esquelético, fígado e baço. Cada órgão foi dividido em duas partes, uma delas foi fixada em formalina tamponada (10%) e processada através da técnica de histologia convencional. Para tanto, cortes seriados de 5µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e examinados em microscópio óptico em toda a sua extensão, determinando-se a presença do parasito (parasitismo tecidual) e a caracterização do infiltrado inflamatório. A intensidade do parasitismo e do processo inflamatório foram assim classificados: (0) = ausência de parasitismo ou de inflamação, (1) = grau discreto, (2) = grau moderado e (3) = grau intenso. A outra parte do material foi preservada em álcool 70% à 4°C para as análises de PCR convencional e qPCR.

#### **4.12 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As amostras de tecido de animais e insetos infectados coletadas foram submetidas à extração de DNA genômico através do método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK E RUSSELL 2001) e em seguida dosadas em espectrofotômetro (BioPhotometer, *Eppendorf*) para a determinação da qualidade e pureza do DNA extraído. Com a finalidade de detectar a presença do parasito nesses tecidos foram utilizados 10 pmol/µl dos iniciadores S35 (AAA TAA TGT ACG GGT GGA GAT GCA TGA) e S36 (GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT) dirigidos a região dos minicírculos do kDNA de *T. cruzi*, em reações de PCR contendo 50 ng do DNA a ser analisado, 200µM de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (*GoTaq Green Master Mix* – Promega) em tampão fornecido pelo fabricante. As reações

iniciaram-se com uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante cinco minutos. Em seguida foram realizados 34 ciclos de desnaturação (94°C por um min), ligação dos iniciadores a sequência alvo (60°C por um min) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72°C por um min), sendo esses passos realizados em um termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Os produtos de PCR obtidos foram resolvidos em géis de poliacrilamida 10% e corados pelo brometo de etídeo (1 mg/ml)

As amostras detectadas positivas através da PCR convencional foram utilizadas para identificação e quantificação diferencial dos parasitos através da detecção dos genes repórteres RFP e GFP pela técnica de PCR em tempo real (qPCR).

Para o gene repórter RFP, os seguintes iniciadores foram utilizados: RFP F: (AGG TCA AGA CCA CCT ACA TG) e RFP R: (CTC GTA CTG TTC CAC GAT G) e para o gene repórter GFP foram utilizados os iniciadores: GFP F: (GAA GCG TTC AAC TAG CAG AC) e GFP R: (GTG GAC AGG TAA TGG TTG TC). As reações foram realizadas utilizando o reagente *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega), com 0,5µM de cada iniciador e 100ng do DNA molde em um volume final de 10µL no aparelho *ABI Prism 7900 HT SDS* (Applied Biosystems). Um controle negativo sem DNA foi adicionado para cada conjunto de iniciadores em todas as placas. As condições térmicas foram de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. A etapa final foi incluída para a obtenção da curva de dissociação (95°C, 60°C e 95°C por 15s cada). ), que apresenta um único pico e temperaturas de Melting distintas para cada gene, sendo em torno de 85,5°C para RFP e 79°C para o GFP.

Visando a quantificação dos parasitos, uma curva padrão foi estabelecida com 7 diluições seriadas (1:10) de concentrações conhecidas dos plasmídeos pTREXRFPNeo e pROCKGFPNeo contendo os genes repórteres RFP e GFP respectivamente.

#### **4.13 Ensaio de infecção em células Vero de parasitos transfectados tratados com pepsina.**

Para avaliar o efeito da pepsina (enzima presente no suco gástrico) sobre a capacidade de infecção celular das cepas TcI e TcII, os parasitos foram incubados pelo período de 1 hora juntamente com 2 mg/ml de pepsina (*Pepsin from porcine gastric mucosa- Sigma-Aldrich*) em tampão citrato pH 3,5. Após incubação, os parasitos foram lavados em PBS adicionados a cultura de células Vero na proporção de 5 parasitos por célula (MAEDA et al., 2016). Após 4 horas de interação as monocamadas de células foram lavadas com PBS para a retirada dos parasitos não internalizados e incubadas em meio DMEM com 5% de soro bovino fetal à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Vinte e quatro horas após a infecção, as monocamadas celulares foram coradas com Giemsa e a taxa de infecção foi determinada pela contagem de células infectadas em 200 células contadas aleatoriamente.

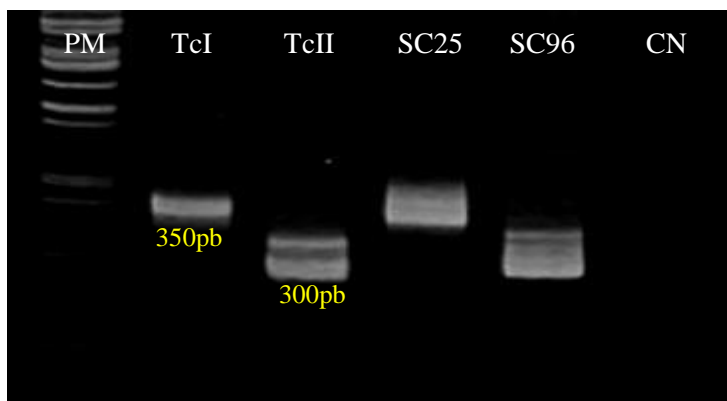
Parasitos das cepas transfectadas TcI e TcII não tratados com pepsina foram utilizados como controle. Adicionalmente, 1mg/ml de BSA foi incubado com 2 mg/ml de pepsina em tampão citrato pH 3,5 por 1 hora à 37°C para comprovar a atividade da enzima. Após a incubação o BSA tratado com a enzima foi submetido a eletroforese em SDS-PAGE e corado com Comassie Blue. Uma amostra de BSA não tratada na concentração de 1 mg/ml foi utilizada como controle.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização genética das cepas de *T. cruzi*

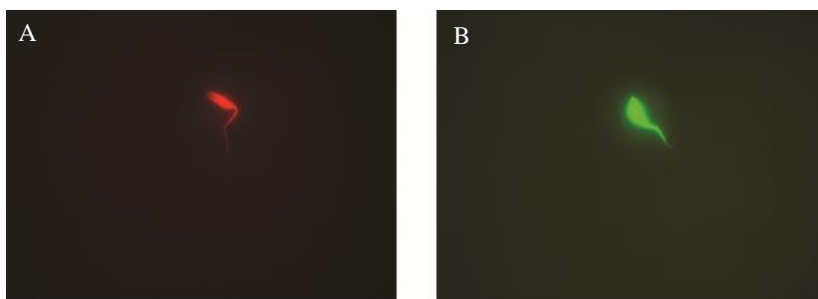
Com o intuito de confirmar se as cepas selecionadas para esse estudo, SC25 e SC96, apresentavam as características genéticas correspondentes às DTUs TcI e TcII, respectivamente, foi realizada a amplificação diferencial de um fragmento do espaçador não-transcrito do gene do mini-éxon segundo protocolo de Souto e colaboradores (1996). Após amplificação específica desse gene, a amostra de DNA da cepa SC25 apresentou um perfil de banda de 350 pares de base (pb), característico de cepas pertencentes à DTU TcI e a cepa SC96 apresentou perfil de banda característico de linhagens pertencentes à DTU TcII (300pb) (figura 3).



**Figura 3:** Perfis de DNA obtidos através da amplificação do gene do mini-éxon de *T.cruzi*. PM: Padrão de peso molecular (plasmídeo pUC digerido com a enzima *Hae* III); TcI: Cepa Colombiana representativa da DTU TcI; TcII: Cepa Y representativa da DTU TcII; CN: Controle negativo da reação de amplificação.

## 5.2 Transfecção integrativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* e seleção de parasitos fluorescentes

Com o objetivo de gerar parasitos transfectantes que expressassem proteínas fluorescentes, parasitos das cepas SC25 foram transfectados com o vetor de expressão pTREXRFPNeo e parasitos da cepa SC96 foram transfectados com pROCKGFPNeo. Após 24 horas da transfecção, já foi possível observar parasitos expressando as proteínas RFP e GFP, evidenciando o sucesso do processo de transfecção. As populações de parasitos transfectados e resistentes ao G418 apresentaram intensas fluorescências vermelha e verde, quando examinadas em microscópio de fluorescência (figura 4). Tanto a mobilidade quanto a morfologia normal dos parasitos foram mantidas, indicando que o processo de transfecção não alterou as características morfológicas das células.

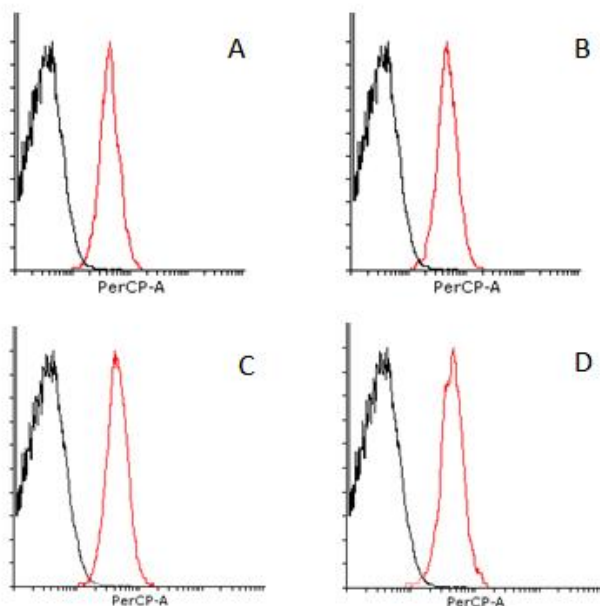


**Figura 4:** Expressão de RFP e GFP pelas formas epimastigotas de *T. cruzi*. A: Cepa SC25 expressando proteína vermelha fluorescente; B: Cepa SC96 expressando proteína verde fluorescente. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus) utilizando objetiva de 100X, filtros para rodamina (A) e FITC (B).

Com a finalidade de selecionar apenas os parasitos que expressassem proteínas fluorescentes, doses crescentes de G418 (250; 500; 750 até 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) foram utilizadas. Parasitos não transfectados também foram expostos as mesmas concentrações do antibiótico para avaliação do tempo de sobrevivência. Nas concentrações acima de 500  $\mu\text{g/ml}$  foi observada a morte dos parasitos controle após 4 ou 5 semanas para a cepa SC25 e 6 semanas para a cepa SC96.

O processo de seleção foi bem sucedido para os parasitos da cepa SC25RFP utilizando doses de G418 acima de 500 µg/ml. Diferenças quanto ao nível de expressão e porcentagem de parasitos fluorescentes não foram observadas quando as culturas transfectadas foram expostas a diferentes concentrações do antibiótico. Para avaliar a estabilidade da expressão de RFP, parasitos foram cultivados durante seis meses na ausência de Geneticin. A retirada total do antibiótico não alterou os níveis de expressão da proteína fluorescente que se mantiveram constantes e semelhantes aos níveis apresentados por parasitos cultivados com as demais concentrações de G418 (figura 5).

As culturas de parasitos com as concentrações de 500; 750 e 1000 µg de Geneticin e ainda parasitos cultivados na ausência do antibiótico foram submetidos à análise por citometria de fluxo. Os histogramas resultantes dessa análise permitem a determinação da porcentagem de parasitos fluorescentes em comparação com o perfil gerado pela cepa não transfectada. Para todas as culturas analisadas as porcentagens de parasitos fluorescentes foram de 95 a 97%, evidenciando o sucesso no processo de seleção e demonstrando que o nível de expressão das proteínas fluorescentes não pode ser aumentado pelo incremento da concentração de antibiótico.



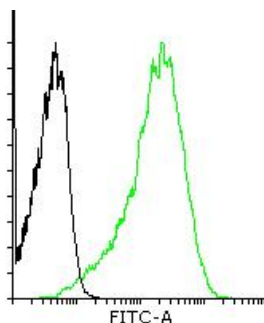
**Figura 5:** Comparação entre parasitos transfectados expostos a diferentes concentrações de Geneticin (G418). Imagens resultantes da análise por citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o perfil de parasitos não transfectados (preto) e parasitos expressando RFP (vermelho). Parasitos transfectados expostos à concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$  de G418 (A); 750  $\mu\text{g/ml}$  (B); 1000  $\mu\text{g/ml}$  (C) e parasitos cultivados na ausência da droga (D). PerCP – filtro para detecção de emissão em 488 nm.

Para a cepa SC96GFP, embora fossem utilizadas as mesmas concentrações do antibiótico, a visualização e a seleção de parasitos expressando fluorescência verde tornaram-se cada vez mais difíceis. No entanto os parasitos dessa cepa transfectada apresentavam resistência a grandes doses de G418. Com a finalidade de selecionar apenas clones de parasitos expressando GFP, foram realizadas clonagens por diluição limitante, no entanto, apenas parasitos não-fluorescentes foram encontrados.

Devido à dificuldade na obtenção de parasitos expressando GFP, epimastigotas da cepa SC96 foram submetidos a um novo processo de transfecção, utilizando neste

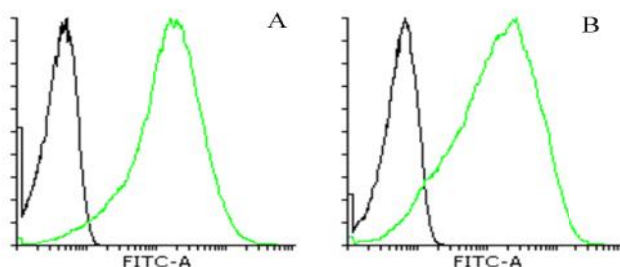
momento o vetor de expressão pTREXGFPNeo e após 24 horas, parasitos fluorescentes já foram visualizados em microscópio de fluorescência. Assim sendo, a cultura dos parasitos transfectados foi dividida em dois tubos e iniciou-se o processo de seleção com o uso de 250 µg e 400 µg/ml de G418. Duas semanas após a adição do antibiótico observou-se uma considerável queda na densidade dos parasitos e foi possível observar uma grande porcentagem de parasitos fluorescentes. Doses crescentes de Geneticin foram adicionadas até a concentração de 1 mg/ml e em seguida, os parasitos foram clonados por diluição limitante a fim de selecionar apenas clones fluorescentes. Após o processo de clonagem foi possível observar que os níveis de fluorescência apresentados pelos parasitos ainda se mostravam bastante distintos, embora não fossem observados parasitos não fluorescentes.

Os parasitos transfectados foram submetidos à citometria de fluxo e os histogramas resultantes dessa análise possibilitaram determinar que aproximadamente 96% dos parasitos da cepa SC96GFP estavam fluorescentes em relação ao perfil gerado pela cepa não transfectada (figura 6). Esses dados mostram que os diferentes níveis de fluorescência observados em microscópio não interferem na análise realizada por citometria de fluxo, que independentemente do nível de fluorescência, foi capaz de detectar o parasito.



**Figura 6:** Histograma dos parasitos da cepa SC96GFP. Imagem resultante da análise por citometria de fluxo no aparelho FACSCanto II. O histograma mostra o perfil de parasitos expressando GFP (verde) em relação aos parasitos não transfectados (preto). Filtro para FITC.

Os parasitos da cepa SC96GFP passaram a ser cultivados na ausência do antibiótico G418 para avaliar a estabilidade da expressão da proteína fluorescente verde e após três meses observou-se que a cultura desses parasitos se comportava de forma semelhante a culturas cultivadas na presença do agente de seleção (figura 7). Os histogramas resultantes da análise por citometria de fluxo mostram que os parasitos cultivados na presença de Geneticin (1 mg/ml) apresentaram aproximadamente 96% de parasitos fluorescentes, enquanto que aqueles cultivados na ausência do antibiótico apresentaram 93% de parasitos fluorescentes.



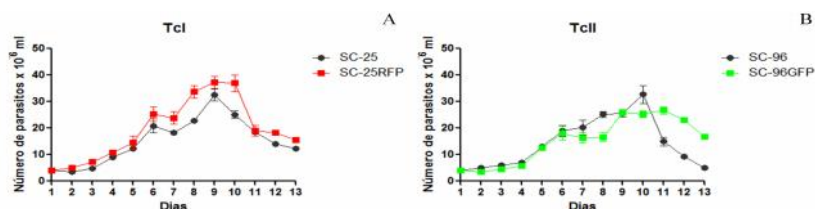
**Figura 7:** Comparação entre parasitos transfectados cultivados na presença ou ausência de Geneticin (G418). Imagens resultantes da análise por citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o perfil de parasitos não transfectados (preto) e parasitos expressando GFP (verde), ambos da cepa SC96. Parasitos transfectados expostos à concentração de 1 mg/ml de G418 (A) e parasitos transfectados cultivados na ausência da droga (B). Filtro para FITC.

### 5.3 Expressão de proteínas fluorescentes nos diferentes estágios de vida do parasito

#### 5.3.1 Avaliação do crescimento *in vitro* das cepas transfectadas em cultivo axênico

Para avaliar se o processo de transfecção e a expressão de proteínas fluorescentes alteram o padrão de crescimento de formas epimastigotas, foram realizadas análises comparativas dos perfis de crescimento dos parasitos transfectadas e

selvagens das cepas SC25 e SC96. Curvas de crescimento das cepas transfectadas e suas cepas parentais mostraram perfil de crescimento semelhante. O número máximo de parasitos no 10<sup>o</sup> dia de cultivo para as cepas SC25 e SC25RFP atingiu  $4 \times 10^7$  parasitos/ml e para as cepas SC96 e SC96GFP o pico ocorreu no 10<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dia de cultivo, respectivamente, atingindo  $3 \times 10^7$  parasitos/ml (figura 8A e 8B). Os resultados demonstram que o procedimento de transfecção não ocasionou diferenças no crescimento e no tempo de duplicação *in vitro* das cepas transfectadas em relação às cepas parentais.



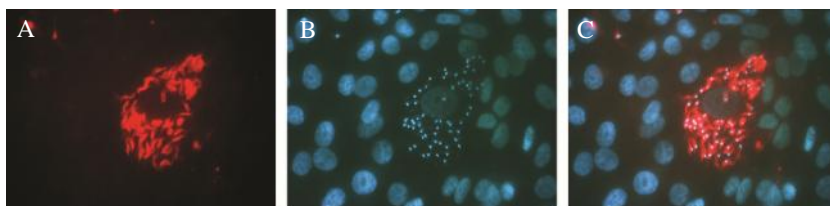
**Figura 8:** Análise comparativa de crescimento das cepas transfectadas de *Trypanosoma cruzi* em relação às cepas parentais. A: Curvas de crescimento das cepas SC25 e SC25RFP; B: Curvas de crescimento das cepas SC96 e SC96GFP. O número inicial de parasitos foi de  $4 \times 10^6$  parasitos/ml. Os dados representam a média de três replicatas biológicas e desvio padrão de contagens diárias para cada uma das cepas.

### 5.3.2 Infecção celular com cepas transfectantes de *T. cruzi*

Com a finalidade de avaliar a expressão de proteínas fluorescentes na forma amastigota e a capacidade de infecção celular das cepas transfectadas, células da linhagem Vero foram infectadas com formas tripomastigotas provenientes de cultura axênica das cepas SC25RFP e SC96GFP. No terceiro dia após a infecção com a cepa SC25RFP foi possível observar formas amastigotas fluorescentes no interior das células. Seis dias após a infecção, os núcleos das células Vero e dos parasitos foram corados com DAPI. As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência e observou-se que os parasitos transfectados da cepa SC25 foram capazes de completar o ciclo

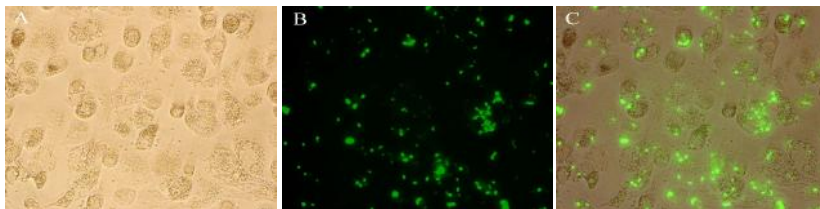
intracelular e manter a fluorescência nas formas amastigota e tripomastigota. (figura 9).

Em várias tentativas de infecção de células Vero com parasitos da cepa SC96GFP não foram observadas formas amastigotas em seu interior indicando que a cepa transfectada foi incapaz de infectar esta linhagem celular. Por esse motivo foram utilizadas células THP-1 que possuem a capacidade de fagocitar o parasito facilitando sua internalização na célula. No dia seguinte à infecção, foram observadas no interior das células, formas amastigotas verdes fluorescentes e sua visualização tornou-se cada vez mais frequente com o passar dos dias, indicando a ocorrência do processo de multiplicação intracelular (figura 10). Embora os amastigotas estivessem presentes na cultura celular, não foram observadas formas tripomastigotas no interior das células ou mesmo no sobrenadante, indicando que o processo de diferenciação de amastigotas para tripomastigotas não ocorreu. Várias tentativas de infecção foram realizadas, mas em nenhuma delas os parasitos da cepa SC96GFP foram capazes de completar o ciclo intracelular. Diante disso, os ensaios subsequentes de co-infecção celular foram realizados com parasitos da cepa Y transfectados de maneira integrativa com o plasmídeo pROCKGFPNeo (desenvolvida pela aluna de mestrado Ana Paula Machado do Nascimento) que apresenta alta capacidade de infecção celular.



**Figura 9:** Células Vero infectadas com parasitos da cepa SC25RFP coradas com DAPI. A figura A representa formas amastigotas de *T. cruzi* expressando proteína fluorescente (RFP); B representa células Vero e parasitos corados com DAPI e C representa a sobreposição das imagens A e B. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus), utilizando objetiva de 100X.

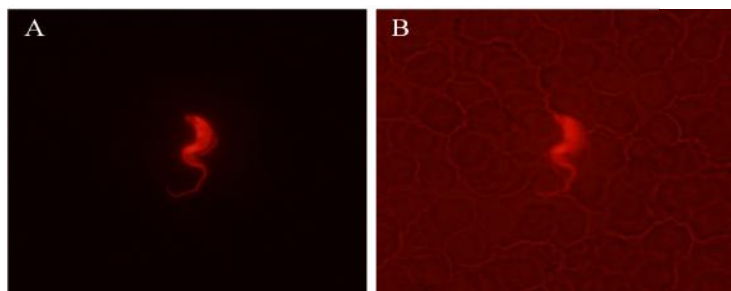




**Figura 10:** Células THP-1 infectadas com parasitos fluorescentes da cepa SC96GFP. A figura A representa células THP-1 infectadas com parasitos da cepa SC-96GFP visualizadas em campo claro; B representa formas amastigotas de *T. cruzi* expressando proteína fluorescente visualizadas utilizando filtro para FITC; C representa a sobreposição das imagens de campo claro e de fluorescência. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus) utilizando objetiva de 40X.

### 5.3.3 Infecção de camundongos BALB/c com a cepa SC25RFP

Nas primeiras infecções de camundongos da linhagem BALB/c inoculados com tripomastigotas da cepa SC25, não foram visualizados parasitos no sangue para ambas as cepas, selvagem e transfectada. Esses animais foram então submetidos a hemocultura, onde aproximadamente 0,5 ml de sangue foi retirado através de punção cardíaca e inoculado em meio LIT. Após um período de 30 dias essas hemoculturas foram examinadas, sendo observada a presença de parasitos para ambas as cepas, comprovando a capacidade das cepas SC25 e SC25RFP de infectarem camundongos. Os parasitos recuperados através de hemocultura foram utilizados para novas infecções em células Vero. Em seguida,  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas foram coletadas do sobrenadante das culturas de células infectadas com ambas as cepas SC25 e utilizadas para inoculação de camundongos BALB/c. Após 16 dias foram visualizados parasitos no sangue dos camundongos infectados. Nos animais infectados com a cepa transfectante SC25RFP, formas tripomastigotas sanguíneas expressando a proteína RFP foram observadas em microscópio de fluorescência (figura 11).

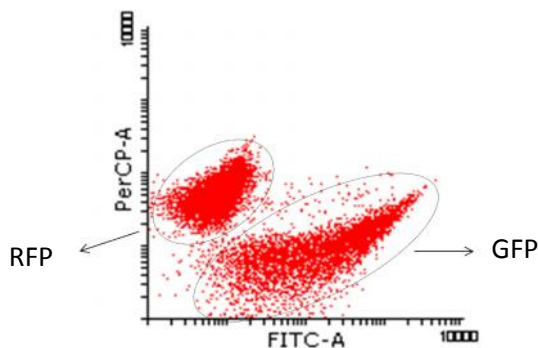


**Figura 11:** Infecção de camundongos BALB/c com tripomastigotas fluorescentes da cepa SC25RFP provenientes de cultura de células Vero. Em (A) imagem de tripomastigota sanguíneo expressando RFP obtida em microscópio de fluorescência Olympus, com objetiva de 100x, utilizando filtro para rodamina, e sobreposta com imagem em luz transmitida (B).

#### 5.4 Avaliação da interação *in vitro* de cepas TcI e TcII em ensaios de co-cultura

##### 5.4.1 Avaliação do crescimento de parasitos transfectados em co-cultivo em meio axênico

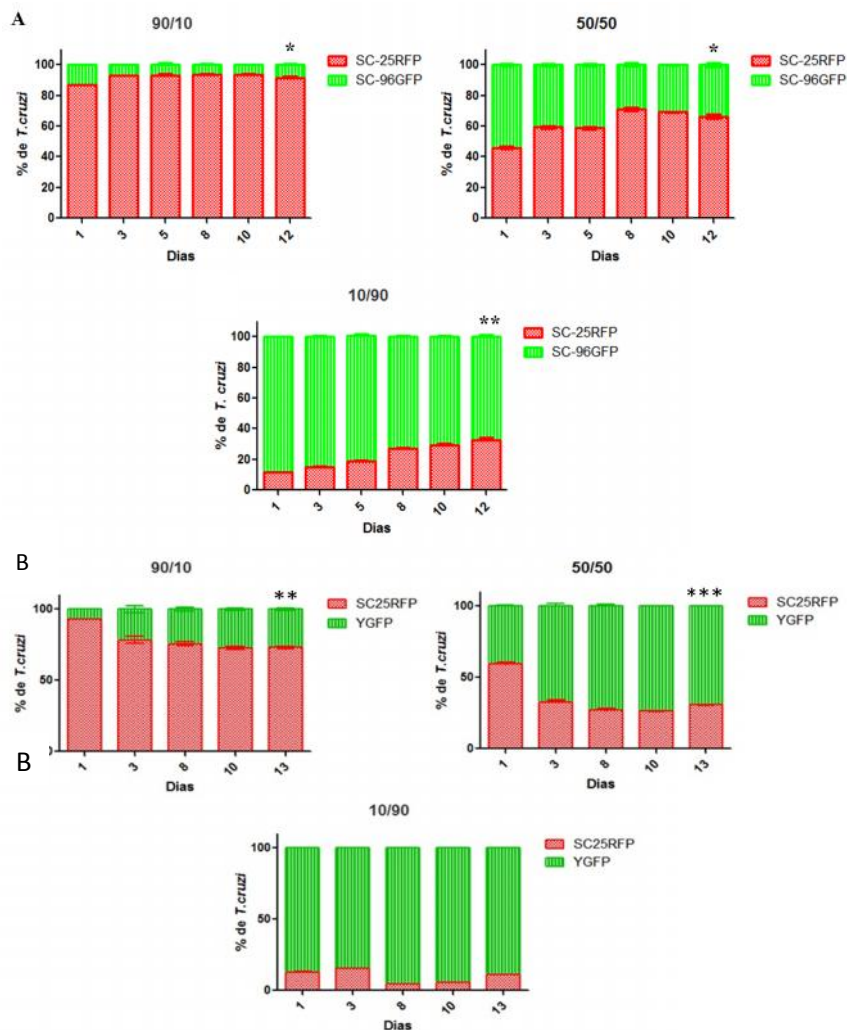
Com o intuito de verificar se a presença de uma linhagem do parasito poderia interferir na cinética de crescimento de outra linhagem em meio axênico, foram realizados ensaios de co-cultura em meio LIT. Os parasitos foram cultivados em misturas com as proporções descritas no item 4.8 e submetidos à análise por citometria de fluxo para determinar se as proporções se mantinham ao longo do cultivo (figura 12).



**Figura 12:** Dot plot de epimastigotas das cepas SC25RFP e SC96GFP. Imagem resultante da análise por citometria de fluxo no aparelho FACS Canto II. O dot plot representa os perfis de quantidades semelhantes de parasitos expressando RFP e GFP. Filtros para FITC e PerCP.

Para a cepa SC25RFP, quando cultivada juntamente com a cepa SC96GFP, houve um crescimento significativo na quantidade de parasitos vermelhos (Tcl) identificados em todas as proporções avaliadas. Esse fato mostrou-se mais evidente no grupo em que a proporção inicial foi de 10% de SC25RFP e 90% de SC96GFP, onde ao final do co-cultivo a cepa Tcl apresentou um percentual três vezes maior de parasitos com relação ao primeiro dia de cultivo, mesmo a cepa SC25RFP apresentando um tempo de duplicação superior à cepa SC96 (figura 13A).

Diferente do observado anteriormente, o co-cultivo entre as cepas SC25RFP e YGFP, mostrou um aumento significativo na proporção de parasitos TcII nos grupos em que o inóculo inicial foi de 90% de parasitos Tcl/ 10% TcII e 50% de parasitos de ambas as cepas. Não houve mudanças significativas nas proporções 10% Tcl e 90% TcII (figura 13B). A cepa YGFP possui um tempo de duplicação em torno de 24 horas o que poderia explicar o aumento da proporção desses parasitos ao longo do co-cultivo com a cepa SC25RFP, cujo tempo de duplicação é de aproximadamente 36 horas. No entanto, a mesma tendência não foi observada no co-cultivo entre a SC25RFP e SC96GFP.



**Figura 13:** Análise de crescimento *in vitro* de epimastigotas das cepas transfectadas de *T. cruzi* em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada cepa. A: Co-cultivo dos parasitos das cepas SC25RFP e SC96GFP e B: Co-cultivo dos parasitos das cepas SC25RFP e YGFP. Os dados representam a média de três replicatas biológicas e desvio padrão de análises de citometria de fluxo realizadas em dias alternados no aparelho FACSCanto II. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0005$  utilizando teste t de *Student* para comparações das

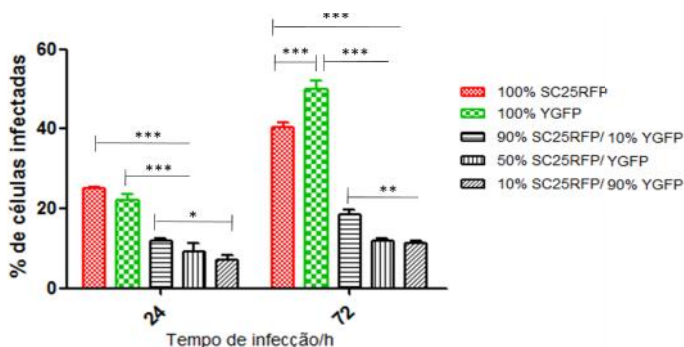
porcentagens obtidas no primeiro e último dia de co-cultivo para todas as proporções avaliadas.

#### **5.4.2 Avaliação da co-infecção experimental de células THP-1 com as cepas transfectadas e suas misturas**

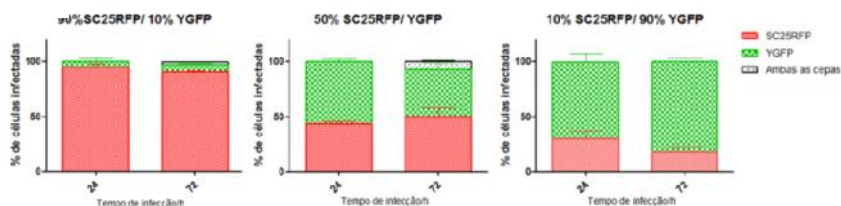
O percentual de células infectadas nos casos de co-infecção mostrou-se inferior aos valores apresentados em infecções isoladas tanto para a cepa de *T. cruzi* TcI quanto para TcII em todos os tempos avaliados. Vinte e quatro horas após infecção as cepas isoladas TcI e TcII apresentaram percentuais semelhantes de células infectadas, no entanto, superiores aos apresentados pelos demais grupos (figura 14 A).

Já após 72 horas de infecção houve um aumento no percentual de células infectadas por parasitos da cepa TcII, apresentando diferenças significativas ( $p < 0,0005$ ) em relação ao percentual de células infectadas por parasitos TcI (figura 16). Ambas as cepas isoladas apresentaram percentuais de infecção celular superiores ao encontrado nas misturas em diferentes proporções ( $p < 0,0005$ ). A mistura contendo 90% de parasitos TcI e 10% TcII apresentou um percentual superior aos demais grupos co-infectados (figura 14 A). Os resultados demonstram que a dinâmica da co-infecção *in vitro* de linhagens distintas de *T. cruzi* apresenta diferenças significativas com relação às infecções celulares com apenas uma cepa, independentemente da proporção de parasitos de cada cepa utilizada como inóculo. Com relação à proporção de parasitos TcI e TcII presente em cada mistura, não houve diferença significativa com relação a proporção de parasitos vermelhos e verdes encontrados no tempos 24 e 72 horas (figura 14 B). Foi observado parasitos TcI e TcII co-habitando uma mesma célula 72 horas após a infecção.

A

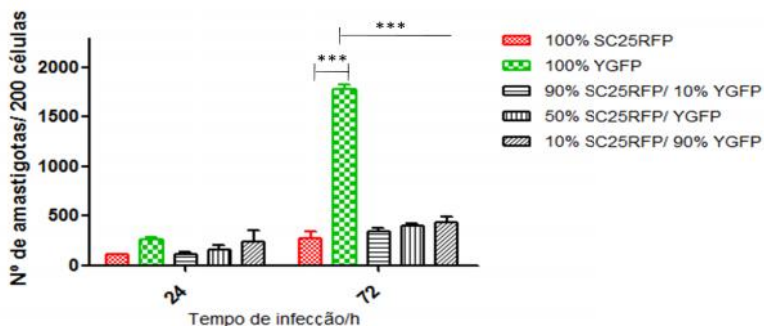


B



**Figura 14:** Representação gráfica do percentual de células THP-1 infectadas com as cepas transfectadas de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções nos tempos 24 e 72 horas após a infecção (A) e a proporção de parasitos TcI e TcII encontrados nas misturas (B). Os resultados representam média e desvio padrão de contagens em triplicata. Utilizado o teste estatístico Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .

Após 24 horas de infecção, o número total de amastigotas contados aleatoriamente em 200 células THP-1, foi semelhante em todos os grupos avaliados. No entanto, após 72 horas a cepa TcII apresentou um número significativamente maior de amastigotas com relação aos demais grupos (figura 15 e 17).

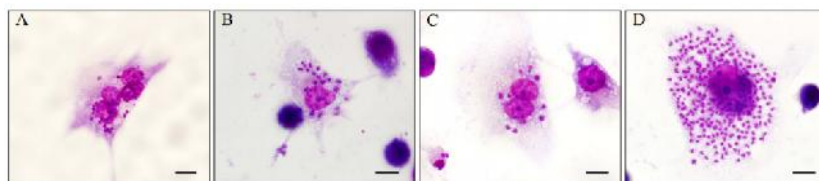


**Figura 15:** Representação gráfica do número total de amastigotas presentes em células THP-1 infectadas com as cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções nos tempos 24 e 72 horas após a infecção. Os resultados representam média e desvio padrão de contagens em triplicata. Utilizado teste estatístico Two-way ANOVA seguido de teste “post-hoc” de Bonferoni \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .

O número total de amastigotas contados nos tempos 24 e 72 horas foram utilizados para calcular o tempo de duplicação em células THP-1, das cepas transfectantes e suas misturas. Os resultados estão dispostos na tabela 2 que mostra a cepa TcI com um tempo de duplicação superior a cepa TcII, porém muito semelhante aos definidos para as misturas de parasitos de ambas as cepas em diferentes proporções.

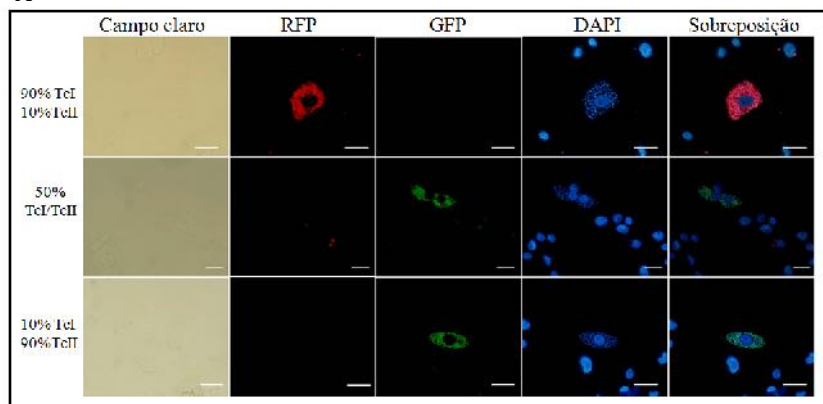
**Tabela 2:** Tempo de duplicação in vitro das cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções em células da linhagem THP-1.

Cepas e Misturas	Tempo de duplicação
SC25RFP (TcI)	38,07
YGFP (TcII)	17,24
90% TcI/ 10% TcII	30,23
50% TcI/ TcII	35,08
10% TcI/ 90% TcII	33,42



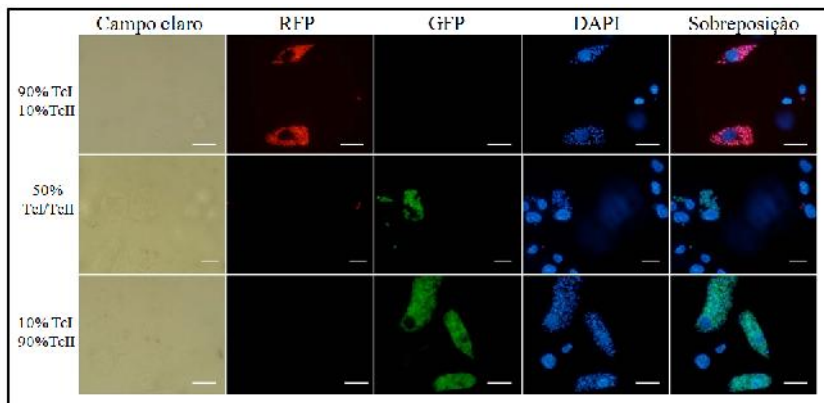
**Figura 16:** Ensaio de infecção de células THP-1 com as cepas transfectadas TcI e TcII. Células e parasitos corados com giemsa em diferentes tempos de infecção. Células infectadas com parasitos da cepa TcI (A) e cepa TcII (C) 24 horas após infecção. Células infectadas com parasitos da cepa TcI (B) e cepa TcII (D) 72 horas após infecção. As barras pretas correspondem a 20 μm.

A





B



**Figura 17:** Ensaio de infecção de células THP-1 com as misturas das cepas transfectadas de *T. cruzi* em diferentes tempos de infecção. A: 24 horas após a infecção. B: 72 horas após a infecção. Utilizados filtros rodamina e FITC para visualização de parasitos RFP e GFP respectivamente. As barras brancas correspondem a 20  $\mu$ m.

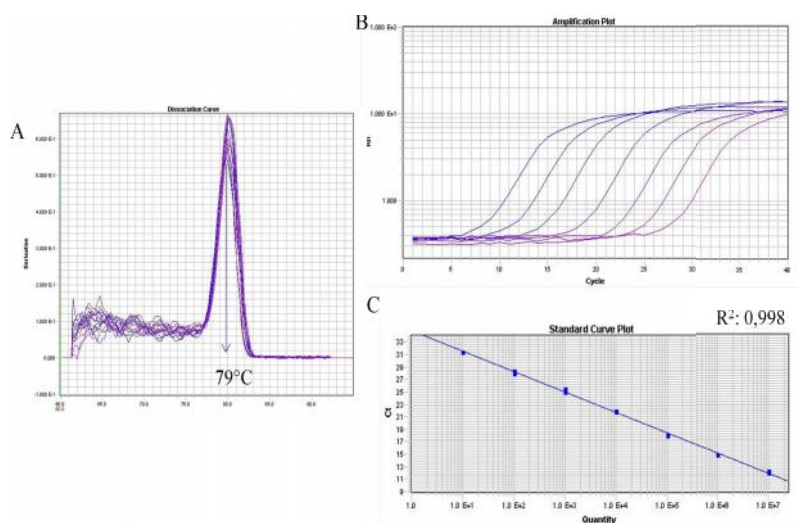
### 5.5 Avaliação da dinâmica da infecção das cepas transfectadas e suas misturas em *Triatoma tibiamaculata*

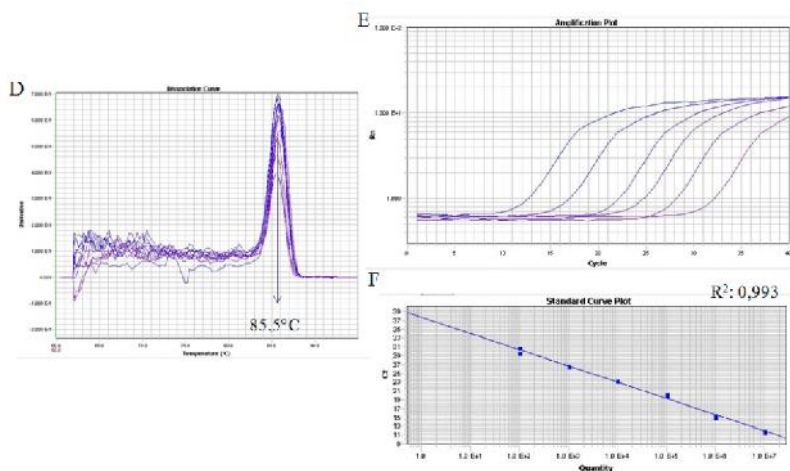
Triatomíneos foram alimentados artificialmente com as cepas transfectadas e suas misturas em diferentes proporções. Para visualizar a infecção com os parasitos fluorescentes, amostras de fezes e urina desses insetos foram coletadas quinze dias após a alimentação. Em triatomíneos infectados exclusivamente com a cepa SC25RFP (TcI) foram observadas formas epimastigotas do parasito expressando a proteína vermelha fluorescente. Nos grupos de insetos infectados exclusivamente com a cepa YGFP (TcII) e nas misturas das cepas transfectantes em diferentes proporções foram observados apenas parasitos expressando GFP. Não foram visualizadas formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes ou urina dos insetos avaliados.

Transcorridos 45 dias da alimentação artificial, o intestino e a ampola retal dos insetos foram retirados e utilizados para extração de DNA e posterior ensaio de PCR para a detecção de *T. cruzi*. Nos triatomíneos alimentados exclusivamente com parasitos da cepa TcI o percentual de insetos infectados foi de 75, já no grupo alimentado com 90% de parasitos TcI e 10 % de

parasitos TcII a taxa de infecção foi de 89%. Nos demais grupos, 100% dos insetos apresentaram infecção.

No intuito de avaliar se a proporção de parasitos transfectantes das misturas utilizadas na alimentação artificial se mantinha ao longo de 45 dias de infecção, as amostras positivas para PCR convencional foram utilizadas em ensaios de qPCR, para a quantificação do número de parasitos encontrados em 100 ng de DNA do triatomíneo. A figura 18 mostra as curvas de dissociação dos iniciadores para os genes GFP e RFP e as curvas padrão para quantificação com valores de  $R^2$  de 0,998 e 0,993 para GFP e RFP respectivamente.





**Figura 18:** PCR em tempo real para quantificação dos genes GFP e RFP presentes nos tecidos de triatomíneos e animais infectados com cepas transfectadas de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções. Curvas de dissociação do DNA amplificado de GFP com pico em torno de 79°C (A) e de RFP com pico em torno de 85,5°C (D). Curvas de amplificação de GFP (B) e RFP (E) demonstrando amplificação nas diluições seriadas do DNA proveniente do plasmídeo pROCKGFPNeo e pTREXRFPNeo respectivamente. Curvas padrão geradas a partir da região linear de cada curva de amplificação de GFP (C) e RFP (F).

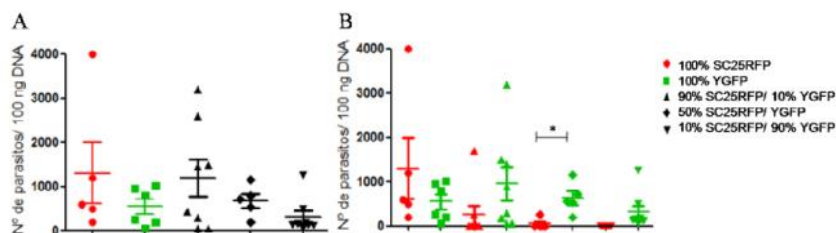
As figuras 19 A e B indicam os resultados da quantificação dos parasitos transfectantes realizada pela qPCR. Em quatro amostras foram detectados números de parasitos abaixo do limite de quantificação ( $10^2$ ), ou seja, possuíam carga parasitária inferior a 100 parasitos, o que permite afirmar sua positividade, mas não permite quantificá-las com precisão. A essas amostras foi atribuído o número arbitrário de 50 parasitos/ 100 ng de DNA apenas para que fosse possível inseri-las no gráfico.

Todos os grupos de triatomíneos infectados apresentaram quantidades semelhantes de parasitos não sendo encontradas diferenças significativas entre o número de parasitos em infecção isolada ou em co-infecções com diferentes proporções de parasitos TcI e TcII (figura 19 A). No entanto, quando analisamos o número de parasitos vermelhos (TcI) e verdes fluorescentes (TcII), observamos um número maior de parasitos pertencentes à

linhagem TcII no grupo de insetos infectados com 50% de ambas as cepas (figura 19 B).

Dos oito insetos infectados com 90% de parasitos TcI e 10% TcII, cinco apresentaram amplificação apenas para o gene GFP e três apresentaram positividade para os genes GFP e RFP indicando a presença das duas cepas. A maioria dos triatomíneos co-infectados apresentou uma proporção maior de parasitos TcII, com exceção de um inseto que apresentou uma quantidade duas vezes maior de parasitos TcI com relação ao número detectado de parasitos TcII presentes nesse triatomíneo.

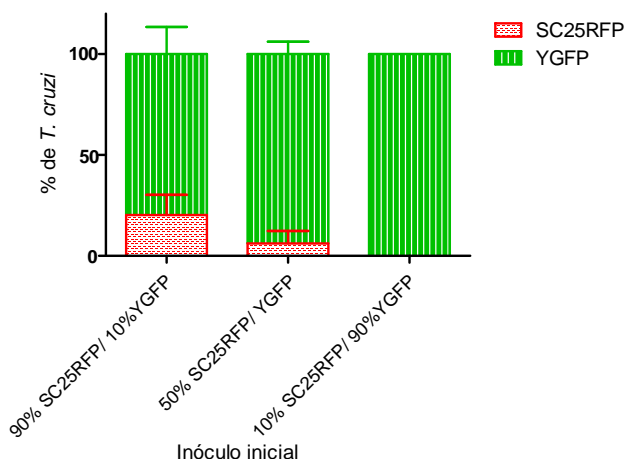
No grupo de triatomíneos alimentados com 50% de parasitos de ambas as cepas, apenas um inseto apresentou co-infecção por TcI e TcII, onde a carga parasitária de TcII foi duas vezes maior que TcI. Os demais insetos do grupo apresentaram infecção apenas por TcII com valores entre  $10^2$  e  $2 \times 10^3$  parasitos/ 100 ng DNA. O grupo de insetos alimentado com 10% de parasitos TcI e 90% de parasitos TcII apresentou infecção apenas pela cepa transfectada TcII.



**Figura 19:** Representação gráfica do número de parasitos detectados por qPCR em 100 ng de DNA de triatomíneos experimentalmente infectados com as cepas transfectadas TcI e TcII de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções. A: Valores totais de parasitos detectados nas misturas. B: Número de parasitos TcI (representados pela cor vermelha) e parasitos TcII (representados pela cor verde). Utilizado teste *t* para comparações entre os grupos (\**p* < 0,05).

Os resultados obtidos a partir da quantificação diferencial dos parasitos foram utilizados para determinar a proporção de parasitos presentes em cada mistura após 45 dias de infecção. O grupo de triatomíneos alimentado com sangue contendo um inóculo inicial de 90% de parasitos TcI e 10% TcII apresentou após 45 dias de infecção uma proporção de aproximadamente

20% de parasitos TcI e 80% de parasitos TcII. Um aumento na proporção TcII também foi observado no grupo de insetos infectados com 50% de ambas as cepas, onde a proporção de parasitos TcI foi menor que 10%. No grupo onde a proporção inicial de parasitos TcI era 10% foram encontrados apenas insetos infectados com a cepa TcII (figura 20).



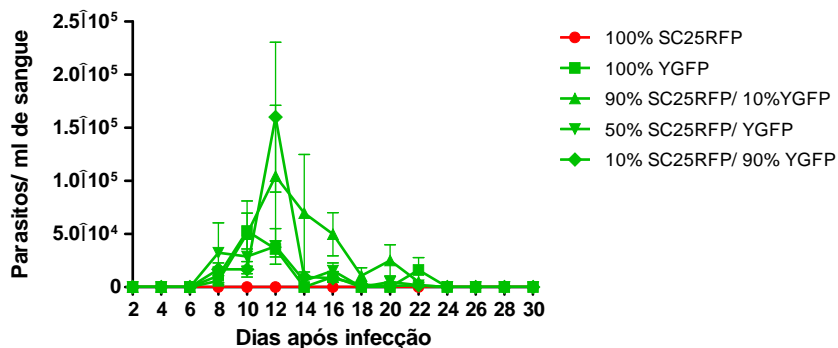
**Figura 20:** Percentual de parasitos transfectados TcI e TcII detectados pela qPCR em amostras de intestino e ampola retal de *T. tibiamaculata* experimentalmente infectados com *T. cruzi* após 45 dias de infecção. Teste two-way ANOVA realizado comparando as proporções do inóculo inicial e de valores obtidos após 45 dias de infecção. \*\*\* ( $p < 0,0005$ ), \*\* ( $p < 0,005$ ).

## 5.6 Avaliação da dinâmica da infecção por via oral das cepas transfectadas e suas misturas em camundongos BALB/c

Todos os grupos de animais infectados com as cepas transfectadas de *T. cruzi* e suas misturas apresentaram parasitemia sanguínea, com um período pré-patente médio de 7 dias e um período patente médio de 14 dias, com exceção dos animais infectados exclusivamente com parasitos da cepa SC25RFP, que não apresentaram parasitemia positiva. As contagens dos parasitos no sangue foram realizadas em microscópio de fluorescência e para todos os grupos analisados

foram encontrados apenas parasitos verdes fluorescentes, ou seja, pertencentes a linhagem TcII (YGFP).

Animais infectados exclusivamente com parasitos YGFP apresentaram pico de parasitemia no 10º dia após infecção enquanto que os demais grupos apresentaram picos de parasitemia no 12º dia. O número máximo médio de parasitos foi semelhante entre os grupos de animais infectados com 100% de YGFP e 50% de ambas as cepas. Já os animais infectados com as demais proporções apresentaram um número médio de parasitos mais elevado, como demonstra a curva de parasitemia (figura 21), no entanto, essas diferenças não foram significativas.

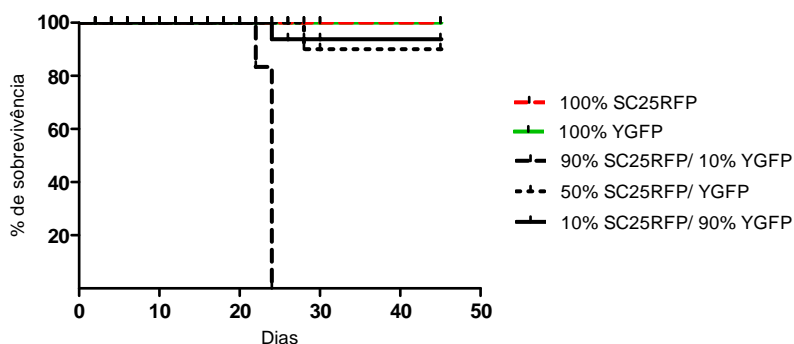


**Figura 21:** Curva de parasitemia média em camundongos BALB/c inoculados por via oral. Os valores correspondem a média e desvio padrão da parasitemia de 6 animais por grupo, inoculados com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas das cepas transfectantes de *T. cruzi* e suas misturas.

Os camundongos inoculados com 100% de parasitos da cepa SC25RFP foram submetidos à punção cardíaca para a retirada de aproximadamente 0,8 ml de sangue que foi posteriormente semeado em meio LIT à 27°C por um período de 60 dias. As hemoculturas desses animais foram avaliadas aos 15, 30, 45 e 60 dias de cultivo e não foram visualizados parasitos, demonstrando que a cepa SC25RFP quando inoculada por via oral, não foi capaz de provocar infecção em camundongos BALB/c.

Embora os animais infectados com 100% de parasitos TcII e as misturas em diferentes proporções tenham apresentado um

perfil parasitêmico semelhante, foram observadas diferenças com relação a taxa de sobrevivência desses animais. O grupo de camundongos infectados exclusivamente com parasitos TcII apresentou a mesma taxa de sobrevivência (100%) dos animais inoculados exclusivamente com parasitos TcI, os quais apresentaram parasitemia e hemocultura negativas. Já os animais inoculados com 90% de parasitos TcI e 10% TcII apresentaram mortalidade de 100% no 24º dia após a inoculação. Os demais grupos apresentaram taxas de sobrevivência em torno de 90% (figura 22).



**Figura 22:** Percentual de sobrevivência em camundongos BALB/c infectados com as cepas transfectadas de *T. cruzi* e suas misturas em diferentes proporções.

Os animais inoculados com as cepas transfectadas e suas misturas foram sacrificados nos tempos 24 horas (T1), 22 dias (T2) e 45 dias (T3) após a infecção. Fragmentos de tecido foram retirados e submetidos à extração de DNA e subsequente amplificação de um fragmento de kDNA de *T. cruzi* com a finalidade de detectar a presença do parasito nos diversos órgãos analisados. A detecção do parasito ocorreu em pelo menos um tecido para os animais dos grupos inoculados com 100% TcII, 90%TcI/ 10% TcII e 50% de ambas as cepas em todos os tempos analisados. Nos animais inoculados exclusivamente com a cepa SC25RFP (100% TcI) não foram detectados parasitos nos tecidos independente do tempo de infecção e para animais inoculados com 10% TcI/ 90% TcII foi

possível detectar o DNA de *T. cruzi* em tecidos apenas nos tempos 1 e 2 (tabela 3).

**Tabela 3** – Representação esquemática dos resultados da detecção de *Trypanosoma cruzi* por PCR utilizando os iniciadores S35 e S36 em amostras de tecidos de camundongos BALB/c inoculados com cepas transfectadas TcI e TcII e suas misturas. X representa amostras positivas para *T. cruzi* e NR representa amostras não realizadas.

Orgãos	T1 (24 horas p.i.)					T2 (22 d.p.i.)					T3 (45 d.p.i.)			
	100%TcI	100% TcII	90% TcI/ 10% TcII	50% TcI/ TcII	10% TcI/ 90% TcII	100%TcI	100% TcII	90% TcI/ 10% TcII	50% TcI/ TcII	10% TcI/ 90% TcII	100%TcI	100% TcII	50% TcI/ TcII	10% TcI/ 90% TcII
Coração	NR	NR	NR	NR	NR		X	X	X	X		X	X	
Músculo Esquelético	NR	NR	NR	NR	NR		X	X	X	X				
Fígado	NR	NR	NR	NR	NR			X	X	X				
Baço	NR	NR	NR	NR	NR			X	X	X			X	
Estômago							X	X	X	X		X		
Duodeno								X	X	X				
Reto		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	

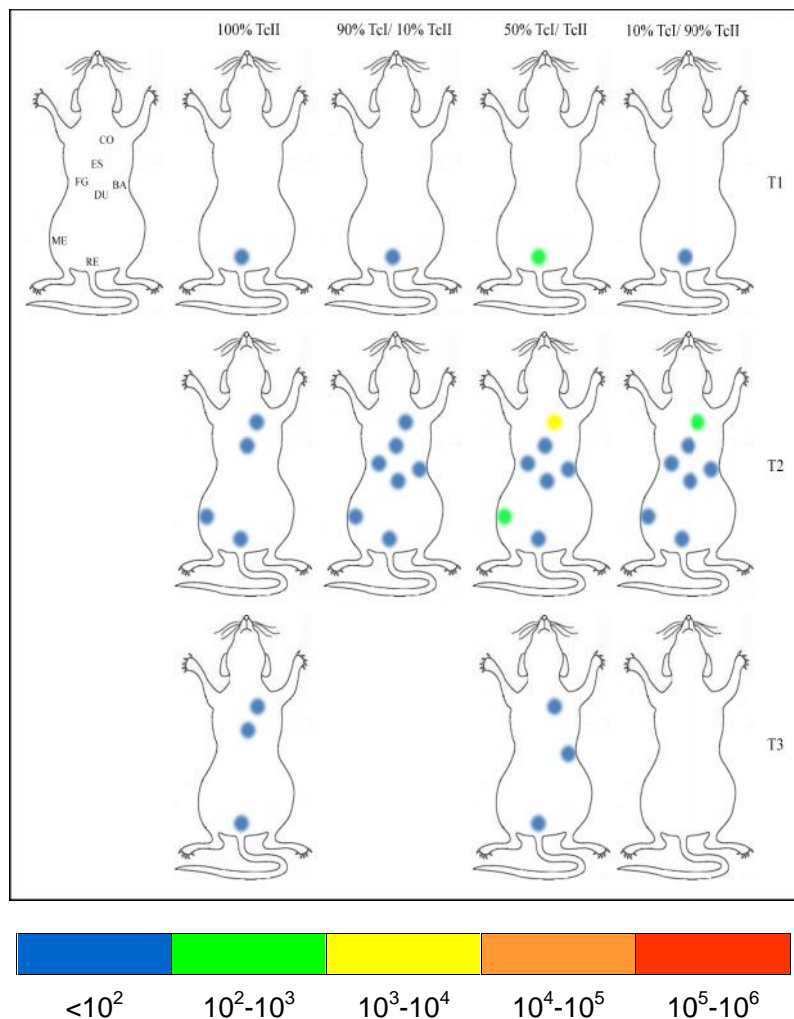
As amostras de tecidos positivas para PCR convencional foram submetidas à técnica de PCR em tempo real (qPCR) com a finalidade de estimar o número de parasitos presentes nos tecidos de animais infectados.

Todas as amostras de tecido analisadas apresentaram amplificação por qPCR apenas para o gene GFP com temperatura de Melting em torno de 79°C, indicando a presença exclusiva de parasitos pertencentes a linhagem TcII. Apesar de positivas a maioria dessas amostras apresentou carga parasitária abaixo do limite de quantificação, que foi definido como 100 parasitos, impossibilitando a quantificação absoluta. A figura 23 mostra a representação gráfica do número máximo de parasitos TcII (GFP) detectados pela qPCR em camundongos BALB/c



infectados com *T. cruzi* nas diferentes proporções e em diferentes tempos de infecção.

Apenas tecidos pertencentes a animais inoculados com 50% de TcI/ TcII e 10% de TcI e 90% de TcII apresentaram carga parasitária acima do limite de quantificação ( $10^2$  parasitos). Os animais infectados com 50% de TcI/TcII e sacrificados 24 horas após a infecção apresentaram um número máximo de 370 parasitos/100 ng de DNA localizados em tecido retirado do reto. Vinte dois dias após infecção o número máximo de parasitos encontrado foi de 5000 parasitos/100 ng de DNA no coração e de 250 parasitos/100 ng de DNA no músculo esquelético. Nos animais infectados com 10% TcI e 90% TcII o número máximo de parasitos encontrados foi de 715 parasitos/100 ng de DNA no tecido cardíaco no segundo tempo de infecção analisado (22 d.p.i).

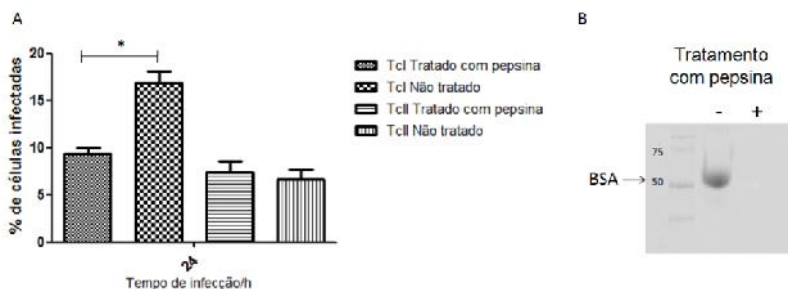


**Figura 23:** Representação gráfica do número máximo de parasitos TcII (GFP) detectados pela qPCR em tecidos de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* nas diferentes proporções e tempos de infecção. As siglas representam os órgãos analisados: CO: coração, ES: estômago, FG: fígado, BA: baço, DU: duodeno, ME: músculo esquelético e RE: reto. Círculos coloridos representam a quantidade de parasitos/100 ng de DNA.

### 5.6.1 Avaliação do perfil de infecção em células Vero de parasitos transfectados TcI e TcII tratados com pepsina.

Resultados anteriores mostraram que embora a cepa SC25RFP (TcI) tenha capacidade de infecção em células Vero e THP-1 e em camundongos BALB/c quando inoculada por via intraperitoneal, esta cepa não apresentou o mesmo perfil de infecção quando inoculada por via oral. Diante disso levantamos a hipótese de que a pepsina (enzima componente do suco gástrico) poderia interferir na capacidade de infecção da cepa TcI.

Após infecção celular, foi observado que o percentual de células infectadas com parasitos TcI que foram tratados com pepsina foi significativamente inferior ao percentual apresentado por parasitos da mesma cepa não tratados com a enzima. Diferenças no percentual de células infectadas com parasitos TcII não foram observadas (figura 24A). A atividade da pepsina foi comprovada pela degradação de 1 mg/ml de BSA (figura 24B).



**Figura 24:** Ensaio de infecção de células Vero com parasitos transfectados das cepas TcI e TcII tratados com pepsina. A: percentual de células infectadas com parasitos TcI e TcII. B: BSA em SDS-PAGE corado com Comassie Blue utilizado como controle da atividade da enzima pepsina. \*  $p < 0,05$  Two-way ANOVA.

### **5.6.2 Análise histopatológica dos tecidos de camundongos BALB/c inoculados com as cepas transfectadas e suas misturas**

Nos cortes histológicos de estômago, duodeno e reto coletados de animais sacrificados 24 horas após a infecção, não foram observadas alterações histopatológicas. Independente do grupo, o aspecto dos tecidos analisados foi semelhante ao de animal controle não infectado.

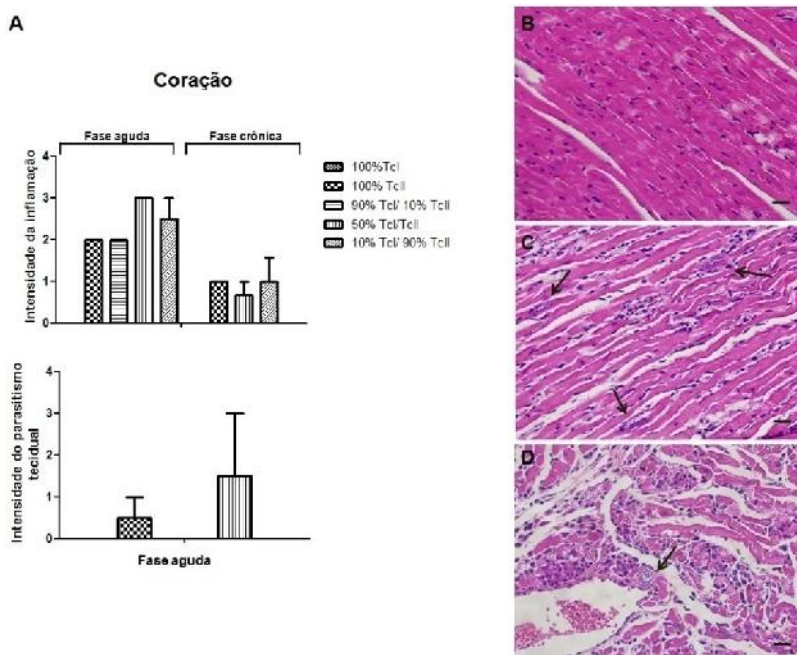
Os tecidos de animais inoculados com 100% de parasitos TcI coletados 22 dias após a infecção (fase aguda) não apresentaram alterações histopatológicas. Já os animais infectados exclusivamente com parasitos TcII apresentaram processo inflamatório discreto no fígado, músculo esquelético, estômago e duodeno. As alterações mais significativas foram observadas no coração com infiltrado inflamatório de intensidade moderada (figura 25 A), com distribuição difusa e presença de parasitismo tecidual discreto (figura 25 D).

Nos animais infectados com 90% de parasitos TcI e 10% TcII na fase aguda (22 d.p.i) foram observadas alterações histopatológicas apenas no coração, fígado, estômago e reto. Todos os tecidos apresentaram infiltrado inflamatório de intensidade moderada, com distribuição difusa e ausência de parasitismo tecidual (figura 26 C). Nesse mesmo tempo de infecção, animais inoculados com 50% de ambas as cepas apresentaram alterações histopatológicas de diferentes intensidades em todos os órgãos com exceção do baço e músculo esquelético. No coração foram observadas as maiores alterações com infiltrado inflamatório intenso, lesão tecidual e presença de intenso parasitismo tecidual (> 10 ninhos de amastigotas) (figura 25 C). Nos animais inoculados com a mistura 10% de parasitos TcI e 90% TcII foram observados infiltrados inflamatórios de grau discreto no estômago, de grau discreto a moderado no fígado (figura 27 C) e de grau moderado a intenso no coração, com presença de lesão tecidual. Para esse grupo não foram encontradas formas amastigotas nos tecidos analisados.

Na fase crônica, os animais inoculados com 100% de parasitos TcI não apresentaram alterações histopatológicas e para os demais grupos foi observada uma diminuição da intensidade do processo inflamatório no tempo 45 dias após a

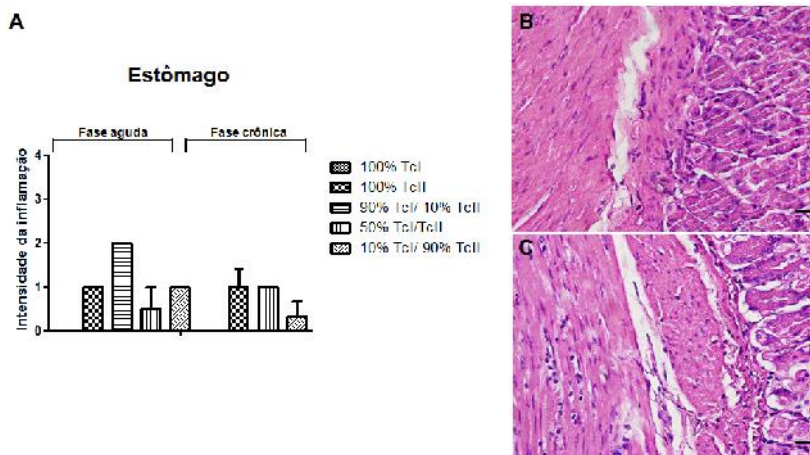
infecção. Camundongos infectados com 100% de TcII apresentaram foco inflamatório discreto na maioria dos tecidos e um grau moderado de inflamação no estômago e reto. Não foram visualizadas alterações histopatológicas no músculo esquelético. Nos grupos de animais infectados com 50% de ambas as cepas e 10% de parasitos TcI e 90% TcII foram observados focos inflamatórios de intensidade discreta no coração, fígado, estômago e reto, mas não foi observado parasitismo tecidual na fase crônica da infecção (45 d.p.i).

Nas figuras abaixo estão representados os órgãos que apresentaram as alterações histopatológicas mais significativas com relação ao processo inflamatório e parasitismo tecidual.

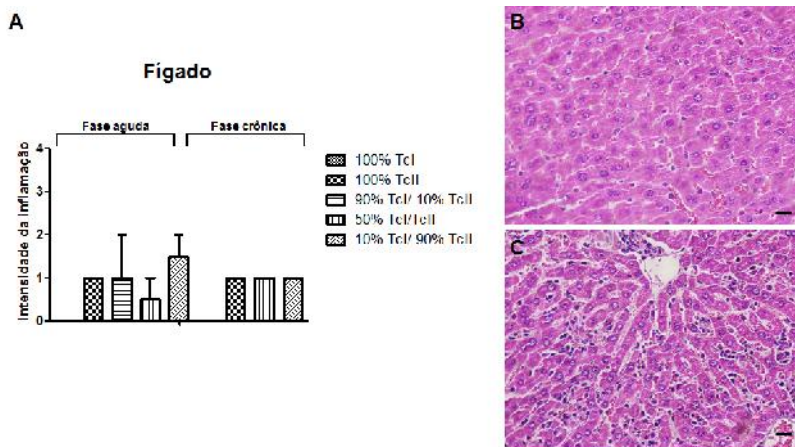


**Figura 25:** Análises histopatológicas de seções de tecido cardíaco corados por HE de animais inoculados com as cepas transfectadas e suas misturas. A: Intensidade do processo inflamatório nas fases aguda e crônica e parasitismo tecidual na fase aguda (0- ausente, 1-discreto, 2- moderado e 3- intenso) presentes nas cepas transfectadas e suas misturas. Imagens representativas de tecido cardíaco de animal não infectado (B), tecido cardíaco de animais infectados com 50% de

parasitos TcI e TcII (C) e tecido cardíaco de animais infectados com 100% de parasitos TcII (D). As barras indicam 20  $\mu$ m e as setas indicam ninhos de amastigotas.



**Figura 26:** Análises histopatológicas de seções de estômago coradas por HE de animais inoculados com as cepas transfectadas e suas misturas. A: Intensidade do processo inflamatório nas fases aguda e crônica (0- ausente, 1-discreto, 2- moderado e 3- intenso), presente nas cepas transfectadas e suas misturas. Imagens representativas de estômago de animal não infectado (B) e estômago de animal inoculado com 90% de TcI e 10% de TcII (C). As barras indicam 20  $\mu$ m.



**Figura 27:** Análises histopatológicas de secções de fígado coradas por HE de animais inoculados com as cepas transfectadas e suas misturas. A: Intensidade do processo inflamatório nas fases aguda e crônica (0- ausente, 1-discreto, 2- moderado e 3- intenso) presentes nas cepas transfectadas e suas misturas. Imagens representativas de tecido hepático de animal não infectado (B) e tecido hepático de animal inoculado com 10%TcI e 90% TcII (C). As barras indicam 20 µm.





## 6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma enfermidade endêmica na América Latina, afetando em torno de oito milhões de pessoas no mundo, sendo considerada atualmente um problema de saúde pública global (WHO, 2015). Desde sua descoberta em 1909, pelo pesquisador Carlos Chagas, avanços no desenvolvimento de técnicas diagnósticas e de caracterização biológica, bioquímica e molecular do *T. cruzi*, vem sendo aprimoradas. Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos que determinam as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

A via oral é provavelmente a mais antiga estratégia de dispersão do *T. cruzi* entre os mamíferos, incluindo o homem (ROQUE et al., 2008). A transmissão por essa via pode ocorrer pela ingestão de vetores e mamíferos infectados ou, através de alimentos contaminados com o parasito a partir de triatomíneos ou suas dejeções, ingestão de carne crua ou mal cozida de animais infectados, ou ainda alimentos contaminados por secreção das glândulas peri-anais de marsupiais infectados (DIAS, 2006).

Nas últimas duas décadas diversos surtos de doença de Chagas aguda adquirida por via oral, a maioria associado à ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, tem sido reportados em diferentes países da América do Sul (VALENTE et al., 1999; STEINDEL et al., 2008; VARGAS et al., 2011; DE NOYA et al., 2015). Muitos desses surtos relatam o possível envolvimento de triatomíneos infectados que são muitas vezes triturados juntamente com diversos tipos de alimento que em seguida são ingeridos, podendo causar infecções com casos agudos graves de doença de Chagas (STEINDEL et al., 2008; de DE NOYA et al., 2015). Co-infecção por diferentes linhagens de *T. cruzi* em triatomíneos presentes em áreas endêmicas para doença de Chagas (SPITZNER et al., 2007) e nos arredores de locais onde ocorreram surtos agudos da doença de Chagas (ANDRADE et al., 2011) e ainda relatos de casos de co-infecção humana por diferentes linhagens de *T. cruzi* (VAGO et al., 2000; MANTILLA et al., 2010), sugerem que eventos de infecção mista ocorram com frequência principalmente no ambiente silvestre. No estado do Espírito Santo foram encontrados parasitos das linhagens TcI, TcII, TcIII e TcIV no tecido cardíaco de um único paciente (DARIO et al., 2016)

Embora a transmissão do *T. cruzi* por via oral esteja se tornando um mecanismo frequente (BASTOS et al., 2010; DIAS, 2015; NOYA et al., 2015), pouco se sabe sobre a dinâmica da infecção por esta via quando há o envolvimento de linhagens genéticas distintas do parasito. Neste contexto se coloca o objetivo central do trabalho que é avaliar os aspectos biológicos e moleculares da interação *in vitro* e *in vivo* das linhagens TcI e TcII de *T. cruzi* em triatomíneos e no modelo murino pela infecção por via oral.

Considerando que as linhagens de *T. cruzi* apresentam características morfológicas muito semelhantes e a necessidade da realização de ensaios que envolvam duas linhagens de parasitos simultaneamente, se fez necessário o desenvolvimento de cepas de *T. cruzi* transfectadas de forma estável com gene repórteres. Neste sentido, proteínas fluorescentes como a RFP e GFP permitem a realização de ensaios de co-infecção facilitando sua detecção nos tecidos de animais e em triatomíneos experimentalmente infectados, além de possibilitar estudo de dinâmica de crescimento em ensaios de co-cultivo *in vitro*.

Para *T. cruzi*, o primeiro plasmídeo desenvolvido foi o pTEX (KELLY et al., 1992). Os autores observaram que após a transfecção, o plasmídeo circular se mantinha de forma episomal no parasito e normalmente era perdido na ausência do antibiótico de seleção. Posteriormente, foram desenvolvidos os plasmídeos pRIBOTEX (MARTINEZ-CALVILLO, 1997) e seu derivado, o pTREX (VASQUEZ E LEVIN, 1999), ambos contendo o promotor de RNA ribossômico que garante alto nível de expressão dos genes repórteres inseridos. A linearização desses plasmídeos possibilita a sua integração no genoma do parasito (LORENZI et al., 2003). DaRocha et al. (2004) construíram um plasmídeo contendo um cassete de expressão direcionado ao locus da tubulina de *T. cruzi*. Este plasmídeo permite a integração de genes exógenos via recombinação homóloga com o locus de  $\beta$ -tubulina, um gene multicópia, facilitando assim o evento de recombinação.

O vetor de expressão pROCKGFPNeo, descrito por DaRocha e colaboradores (2004), foi utilizado para transfectar epimastigotas da cepa SC96. Vinte e quatro horas após a eletroporação observou-se parasitos fluorescentes e os mesmos foram submetidos à pressão seletiva frente ao G418. Entretanto, o número de parasitos expressando fluorescência verde foi

decaindo drasticamente ao longo de sete semanas, embora, os parasitos continuassem resistentes ao antibiótico. Segundo Pires e colaboradores (2008), é possível que o parasito tenha perdido o gene GFP em eventos de recombinação, que podem afetar a expressão de proteínas fluorescentes, mas garantiu a expressão do gene de resistência ao antibiótico. Em virtude desses resultados uma nova transfecção da cepa SC96 foi realizada utilizando o plasmídeo pTREXGFPNeo desenvolvido por DaRocha e colaboradores (2004). A expressão da GFP foi comprovada 24 horas após a transfecção e a seleção dos parasitos na presença de G418 demonstrou um aumento no número de células fluorescentes, embora com níveis de expressão heterogêneos. Contrariamente, Goyard e colaboradores (2014) utilizando o mesmo plasmídeo pTREX reportaram que parasitos transfectados da cepa CL Brener apresentando uma emissão homogênea de fluorescência. Este resultado sugere que diferenças no nível de expressão e na heterogeneidade de fluorescência podem estar relacionadas às diferenças genética entre os diferentes genótipos de *T. cruzi*, ou mesmo entre as diferentes cepas de um mesmo genótipo (RAMIREZ et al., 2000).

A cepa SC25 transfectada com o plasmídeo pTREXRFPNeo apresentou parasitos fluorescentes 24 horas após a transfecção e a seleção com G418 resultou em parasitos expressando elevados níveis de fluorescência e de maneira estável. Pires e colaboradores (2008) observaram parasitos fluorescentes doze horas após a transfecção com esse mesmo plasmídeo, no entanto, mesmo na presença de G418 não foram observados parasitos expressando proteína fluorescente após vinte dias. Ao transfectar epimastigotas da cepa CL Brener com o mesmo plasmídeo, DaRocha e colaboradores (2004), observaram apenas 10% de parasitos fluorescentes, proporção essa que foi reduzida a 1% após 17 dias. Ao utilizar o vetor pTREXGFP para transfectar a cepa CL Brener, Guevara e colaboradores (2005) observaram 100% dos parasitos fluorescentes após sete dias na presença de 500 µg de G418. Porcentagens semelhantes de parasitos fluorescentes foram observadas para as cepas SC25RFP e SC96GFP, entretanto, a seleção dos parasitos só ocorreu aproximadamente três meses após a transfecção. O processo de seleção de parasitos transfectados de maneira integrativa com o plasmídeo pTREX, é

mais lenta que aqueles transfectados de maneira episomal (LORENZI et al., 2003).

A estabilidade da expressão das proteínas fluorescentes foi avaliada cultivando-se os parasitos transfectantes na ausência de G418, e os resultados obtidos com os dois genes repórteres mostraram a manutenção dos níveis de expressão das proteínas fluorescentes até seis meses após a retirada do antibiótico, sugerindo a integração do plasmídeo no genoma do parasito.

Diferenças no percentual de parasitos fluorescentes que variam de experimento para experimento, e também de acordo com a cepa utilizada podem ser observadas após a transfecção. Essas diferenças podem ser ocasionadas por pequenas variações nas condições de crescimento de cada cultura, interferências no processo de eletroporação ou na quantidade de DNA plasmidial adicionado às células e ainda, que algumas cepas possam ser menos susceptíveis a transfecção (RAMIREZ et al., 2000). Apesar disso Pires e colaboradores (2008) desenvolveram diversas linhagens de *T. cruzi* expressando proteínas fluorescentes que mantiveram as características biológicas das cepas parentais, enquanto que Ramirez e colaboradores (2000) não conseguiram gerar parasitos transfectados de cepas pertencentes à linhagem TcI. Estes autores atribuem o insucesso ao fato do promotor ribossomal presente na construção utilizada ser proveniente de uma cepa TcII. Esses dados contrastam com os resultados do presente trabalho, no qual parasitos fluorescentes da cepa SC25 (TcI) foram obtidos de maneira estável mesmo sem a presença de G418.

Os parasitos transfectados das cepas SC25 e SC96 não apresentaram diferenças significativas de crescimento em relação às respectivas cepas parentais. Esses resultados corroboram os dados reportados por Kessler e colaboradores (2013) para a cepa Dm28c transfectada, sugerindo que o processo de transfecção não alterou a capacidade de crescimento *in vitro* dos parasitos.

Células Vero e THP-1 foram infectadas com formas tripomastigotas provenientes de cultura axênica a fim de comprovar a expressão de RFP e GFP em diferentes fases do ciclo de vida de *T. cruzi*. Formas amastigotas fluorescentes em processo de divisão foram observadas no citoplasma celular para ambas as cepas, mantendo o mesmo padrão de expressão de

RFP e GFP. Resultados semelhantes foram reportados por Goyard e colaboradores (2014) e Pires e colaboradores (2008), em células Vero infectadas com diversas linhagens de *T. cruzi* expressando proteínas fluorescentes. Da mesma forma, amastigotas de *Leishmania amazonensis* transfectadas com RFP não demonstraram alterações no nível de expressão da proteína fluorescente na infecção de macrófagos (ROCHA et al., 2012).

Camundongos da linhagem BALB/c inoculados com tripomastigotas de cultura celular da cepa SC25RFP apresentaram tripomastigotas sanguíneos fluorescentes circulantes no sangue. Outros autores mostraram a presença de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* expressando GFP (PIRES et al., 2008) e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma vivax* expressando a proteína vermelha E2-Crimson (GOYARD et al., 2014) no sangue de camundongos experimentalmente infectados.

Camundongos BALB/c inoculados com a cepa SC96GFP não apresentaram parasitemia sanguínea detectável, mesmo após várias tentativas. Por esse motivo e ainda por não possuírem capacidade de completar o ciclo intracelular em células THP-1, os experimentos de interação parasito-célula e de infecção em camundongos BALB/c e triatomíneos foram realizados com a cepa transfectante YGFP. Essa cepa foi desenvolvida pela aluna Ana Paula Machado do Nascimento durante seu mestrado, e apresenta alta capacidade de multiplicação intracelular e infecção em camundongos.

O desenvolvimento de parasitos transfectados que expressem de maneira estável e integrativa proteínas fluorescentes além de facilitar a detecção e visualização do *T. cruzi*, pode auxiliar na triagem de novos fármacos (KESSLER et al., 2013; MIRANDA et al., 2015), além de proporcionar o uso de novas técnicas na tentativa de elucidar mecanismos de infecção celular e patogenicidade da doença de Chagas (FERREIRA et al., 2016).

Ensaio de co-cultura em meio axênico com diferentes proporções de parasitos das cepas transfectadas SC25RFP e SC96GFP foram avaliados por citometria de fluxo em dias alternados por um período de 12 dias. Todas as proporções avaliadas mostraram um perfil de crescimento favorável à cepa SC25RFP, em especial no cultivo dos parasitos na proporção 10% da cepa SC25RFP e 90% da cepa SC96GFP, apesar da

cepa TcI apresentar um tempo de duplicação superior à TcII (36 horas para SC25RFP e 30 para SC96GFP). Resultados semelhantes foram observados por Araújo e colaboradores (2007) com a cepa M1 (TcI) e JCPD4 (TcII) em uma mistura de mesma proporção. Esses autores mostraram que a cultura mista apresentou um perfil de crescimento *in vitro* mais relacionado ao observado para a cepa TcI, sugerindo a existência de algum mecanismo de modulação do crescimento dos parasitos TcII em co-cultura.

No entanto, quando o mesmo ensaio foi realizado com as cepas SC25RFP (TcI) e a cepa YGFP (TcII), os resultados mostraram um perfil de crescimento favorável a cepa TcII em pelo menos duas proporções avaliadas. Esses resultados sugerem que a dinâmica da co-infecção pode estar mais relacionada ao tempo de duplicação das cepas utilizadas do que à DTU que elas pertencem, visto que a cepa Y apresenta um tempo de duplicação em torno de 19 horas.

Para avaliar a dinâmica da co-infecção, células da linhagem THP-1 foram infectadas com os parasitos transfectados das cepas SC25RFP (TcI) e YGFP (TcII) isoladamente e com as suas misturas em diferentes proporções. Os resultados obtidos mostraram que em co-infecções os percentuais de células infectadas foram inferiores aos demonstrados em infecções com as cepas isoladamente. Mesmo nas proporções em que o inóculo inicial era de 90%, ou seja, muito próximo ao inóculo utilizado na infecção isolada, as taxas de infecção ainda se mostraram inferiores. Tal fato mostrou-se mais evidente 72 horas após a infecção, sugerindo que durante a co-infecção exista algum tipo de modulação que reduz a capacidade de infecção dos parasitos na presença de infecção mista. Apesar de apresentarem percentuais de infecção inferiores aos demonstrados pelas cepas TcI e TcII, o número de amastigotas presentes nas células infectadas com misturas de parasitos mostrou-se semelhante ao número de amastigotas presentes nas células infectadas com parasitos TcI. No entanto, o número de amastigotas encontrado em células infectadas com parasitos TcII foi muito superior indicando uma maior capacidade de replicação da cepa Y. O mesmo fato foi observado por Toma e colaboradores (2000) ao utilizar cepa de *T. cruzi*, incluindo a cepa Y, com diferentes níveis de virulência para camundongos frente a 3 linhagens celulares. Neste estudo os autores mostraram que cepas de baixa

virulência para camundongos ocasionaram as maiores taxas de infecção e multiplicação intracelular, a exceção da linhagem celular L929, onde a taxa de multiplicação intracelular foi maior para a cepa Y.

Apesar das misturas de parasitos apresentarem diferenças no percentual de células infectadas com relação às infecções isoladas, a proporção de parasitos TcI e TcII encontrados ao longo das 72 horas de infecção permaneceu a mesma. Embora não existam diferenças significativas nas proporções de parasitos, notou-se um pequeno percentual de células co-infectadas. Estudo de infecção celular utilizando parasitos fluorescentes de diferentes linhagens mostrou que apenas 1% das células apresentou co-infecção, sugerindo que a infecção de diferentes cepas de *T. cruzi* em uma mesma célula seja um evento raro (PIRES et al., 2008).

Após observar diferenças no padrão de infecção celular com misturas de parasitos TcI e TcII, o objetivo seguinte deste trabalho foi avaliar a dinâmica da infecção dessas misturas no inseto vetor. Triatomíneos da espécie *Triatoma tibiamaculata* foram utilizados nesse estudo devido ao fato de essa espécie ter sido encontrada nos arredores do local onde ocorreu o surto de doença de Chagas aguda em Santa Catarina (STEINDEL et al., 2008). Estudos realizados com isolados de *T. cruzi* provenientes desses insetos mostraram co-infecção dos triatomíneos por parasitos TcI e TcII (STEINDEL et al., 2008; ANDRADE et al., 2011). Contudo, a caracterização molecular de 9 cepas isoladas de pacientes em fase aguda da infecção, mostrou que todos isolados foram TcII e apenas um isolado também apresentou parasitos TcIV (STEINDEL et al., 2008; ANDRADE et al., 2011). A ausência de parasitos da linhagem TcI em todos os isolados de pacientes, sugere uma maior adaptação da linhagem TcII em humanos. Estudos realizados com cepas naturalmente mistas e com misturas artificiais de parasitos TcI e TcII em macrófagos murinos e humanos mostrou uma seleção favorável da linhagem TcII ao longo de três passagens consecutivas nestas linhagens celulares (PENA et al., 2011).

Neste estudo, insetos *T. tibiamaculata* foram alimentados artificialmente com sangue de camundongo contaminado com parasitos das cepas transfectantes TcI e TcII e suas misturas em diferentes proporções. Após 15 dias de infecção ao examinar as fezes e/ou urina dos triatomíneos infectados foi possível

visualizar parasitos fluorescentes, demonstrando que os transfectados foram capazes de manter o mesmo nível de fluorescência no interior dos insetos vetores. Outros autores relataram a visualização de parasitos de *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli* fluorescentes em intestino e hemolinfa de *R. prolixus* experimentalmente infectados (SANTOS e BUCK, 2000; GUEVARA et al., 2005). Nos insetos infectados exclusivamente por TcI foram observados parasitos expressando fluorescência vermelha e no grupo de insetos infectados exclusivamente com TcII e nos grupos onde continham misturas de ambas as cepas foram visualizados apenas parasitos verdes fluorescentes, indicando que possivelmente os insetos infectados com misturas já demonstrassem uma proporção maior de parasitos TcII após aos 15 dias de infecção. Foi observado que os parasitos transfectados foram capazes de manter a fluorescência

Para confirmar o observado por microscopia de fluorescência, o intestino e ampola retal desses insetos foram retirados após 45 dias de infecção e submetidos à extração de DNA. Amostras de todos os grupos infectados foram submetidas a PCR convencional cujos resultados mostraram que 75% dos insetos alimentados exclusivamente com parasitos TcI e 89% dos insetos alimentados com 90% de parasitos TcI e 10% TcII apresentavam infecção por *T. cruzi*. Nos demais grupos todos os triatomíneos estavam infectados. As amostras positivas foram utilizadas em ensaios de qPCR para a quantificação de parasitos TcI e TcII presente nos insetos.

Triatomíneos infectados com as cepas TcI e TcII e suas misturas apresentaram quantidades semelhantes de parasitos, no entanto a proporção de parasitos TcI e TcII observadas nos grupos onde havia mistura das duas cepas foi drasticamente alterada ao longo dos 45 dias de infecção. Houve aumento significativo na proporção de parasitos TcII nos grupos em que o inóculo inicial era de 90% de parasitos TcI e 10% TcII e 50% de parasitos de ambas as cepas. Para o grupo onde a proporção inicial era de 10% de parasitos TcI e 90% de TcII foram detectados apenas parasitos TcII.

Esses resultados sugerem na co-infecção em *T. tibiamaculata*, com as cepas utilizadas houve uma modulação do crescimento dos parasitos durante a infecção no inseto, já que os triatomíneos infectados exclusivamente com a cepa TcI ou TcII apresentaram taxas de infecção e número de parasitos



semelhante, enquanto que na co-infecção o número de parasitos TcI cai drasticamente. Infecções mistas experimentais em *Triatoma infestans* utilizando diferentes clones TcI e TcII de *T. cruzi* mostraram que não houve um padrão de predominância de uma linhagem em relação a outra durante a infecção (PINTO et al., 2000) o que sugere que o sucesso na manutenção da co-infecção ou o aumento de uma população em detrimento de outra esteja relacionado principalmente a características intrínsecas das cepas de *T. cruzi* e da adaptação dessa linhagem ao inseto vetor. No entanto, estudos de infecção mista experimental em *R. prolixus* utilizando parasitos TcI e TcII demonstraram a predominância de parasitos TcI em co-infecções, sugerindo uma maior adaptação dessa linhagem a infecção nessa espécie de triatomíneo (ARAUJO et al., 2007) e ainda que a co-infecção pode melhorar o crescimento e a metaciclo gênese de *T. cruzi* nesse mesmo vetor (ARAUJO et al., 2014).

Para avaliar a dinâmica da infecção no hospedeiro mamífero, camundongos BALB/c foram inoculados por gavagem com caldo de cana contendo os parasitos TcI e TcII e suas misturas em diferentes proporções. Sete dias após a infecção foram visualizados parasitos fluorescentes no sangue de animais de todos os grupos inoculados, exceto nos camundongos inoculados exclusivamente com a cepa SC25RFP (TcI).

Após a realização de hemocultura e PCR foi comprovado que a cepa TcI não ocasionou infecção em camundongos inoculados por via oral. Contudo, a cepa SC25, caracterizada como cepa TcI de média virulência, ocasiona parasitemia patente em camundongos quando inoculada por via intraperitoneal (STEINDEL et al., 1995). Esse fato foi comprovado no presente trabalho onde foi possível recuperar parasitos transfectantes da cepa SC25 do sangue de animais infectados pela via intraperitoneal, sugerindo que a via de inoculação possa ter afetado a capacidade de infecção da cepa TcI. Estudos de outros autores mostraram que animais inoculados por via oral utilizando gavagem apresentaram níveis de parasitemia inferiores aos demonstrados por animais inoculados com o mesmo número de parasitos por via intraperitoneal (DIAS et al., 2013; DOMINGUES et al., 2015). Níveis superiores de parasitemia e mortalidade foram encontrados em camundongos inoculados por via oral quando comparados com animais inoculados por via intragástrica

(gavagem), sugerindo que o processo de gavagem pode interferir na sobrevivência ou capacidade de infecção de algumas cepas de *T. cruzi* (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015).

Os animais inoculados com a cepa TcII isoladamente e com as misturas em diferentes proporções apresentaram perfis parasitêmicos semelhantes, não demonstrando diferenças significativas com relação ao dia do pico de parasitemia e ao número máximo médio de parasitos detectados por exame de sangue a fresco. A contagem dos parasitos em microscópio de fluorescência, mostrou apenas formas tripomastigotas sanguíneas expressando a GFP, o que indica a presença apenas de parasitos TcII (YGFP). A cepa Y apresenta grande capacidade de multiplicação intracelular e é amplamente utilizada em estudos de infecção animal por apresentar altos níveis de patogenia e mortalidade para camundongos (SILVA E NUSSENZWEIG, 1953) e ainda possui a capacidade de estabelecer infecção em camundongos quando inoculada por via oral (DIAS et al., 2013).

Apesar da semelhança no perfil parasitêmico apresentado pelos animais inoculados com 100% de TcII e animais dos grupos inoculados com as misturas, as taxas de sobrevivência variaram de 100% para os animais do grupo infectado apenas por TcII e em torno de 90% nos grupos infectados com 50% de ambas as cepas e 10% de parasitos TcI e 90% TcII. Surpreendentemente, os animais do grupo inoculado com 90% de parasitos TcI e 10% de parasitos TcII apresentaram uma taxa de mortalidade de 100%. Mesmo com um inóculo inferior quando comparado aos demais grupos, a infecção nesses animais mostrou-se mais agressiva. Não ocorreu mortalidade no grupo de animais inoculados com 100% de TcI, o que já era esperado tendo em vista que os camundongos desse grupo não apresentaram infecção por *T. cruzi*.

Os animais infectados foram sacrificados em diferentes tempos de infecção. Amostras de tecidos retiradas desses animais foram divididas em duas partes, uma para ensaios histopatológicos e outra para a realização de PCR para determinar a presença de *T. cruzi* em diversos órgãos. Como já era esperado não foram detectados parasitos nos tecidos de animais inoculados com 100% de parasitos TcI em todos os tempos avaliados.

Nos animais sacrificados 24 horas após a infecção, foram detectados parasitos presentes no reto de camundongos inoculados com a cepa TcII e nos grupos inoculados com misturas. Não foram detectados parasitos no estômago ou duodeno. Cortes histológicos de estômago de animais inoculados com *T. cruzi* por via oral foram analisados no quarto dia de infecção e assim como no presente trabalho não foram encontrados parasitos nesse órgão (MAEDA et al., 2016).

Já no segundo tempo de infecção (22 d.p.i.) foram detectados parasitos no coração, músculo esquelético, estômago e reto de animais infectados apenas por TcII. Nos demais grupos foram detectados parasitos em todos os órgãos analisados: coração, músculo esquelético, fígado, baço, estômago, duodeno e reto. Na fase aguda da infecção o número de parasitos circulantes é alto e há maiores chances de detectar os parasitos espalhados por diversos órgãos antes que a infecção se estabeleça e os parasitos comecem a se concentrar nos tecidos pelos quais têm tropismo. Quarenta e cinco dias após a infecção, período considerado fase crônica na infecção experimental em camundongos, foi detectado um número menor de órgãos parasitados com relação à fase aguda. Foram encontrados parasitos no coração, estômago e reto de animais infectados com 100% de TcII e parasitos presentes no coração, baço e reto no grupo de animais inoculados com 50 % de ambas as cepas. Esses resultados corroboram com o estudo que demonstra a detecção de um número maior de parasitos na fase aguda da doença de Chagas experimental utilizando diversas cepas TcII como inóculo (GRUENDLING et al., 2015).

As amostras de tecidos positivas para a PCR convencional foram utilizadas em ensaios de qPCR com o objetivo de quantificar os parasitos presentes nos tecidos. Em todas as amostras analisadas, mesmo naquelas provenientes de animais inoculados com misturas de parasitos, foram observadas amplificações apenas para o gene GFP, o que confirmou que a cepa TcI (RFP) não foi capaz de estabelecer infecção por via oral. Estudo realizado com diferentes cepas TcI mostra uma diversidade no perfil de infecção e patogenicidade dessas linhagens que podem estar mais associadas ao ambiente domiciliar (TcI<sub>DOM</sub> - responsável por manifestações clínicas mais graves da doença) ou ao ambiente silvestre (TcI) (CRUZ et al., 2015). Essa diversidade pode também estar relacionada à

capacidade de infecção da mucosa gástrica e resistência dos parasitos TcI ao ambiente gástrico, promovendo ou inibindo a infecção por via oral (YOSHIDA, 2008).

Para a determinação do número de parasitos presentes nas amostras de tecido dos animais infectados por parasitos TcII, foi determinado o limite mínimo de quantificação, ou seja, a menor concentração em que o produto analisado é quantificado de forma fiável (BURD, 2010). Padronização anterior a esse estudo demonstrou um limite de quantificação de  $10^2$  parasitos/ 100 ng de DNA para os iniciadores RFP e GFP utilizando SYBR Green.

Os grupos de animais infectados com TcII e misturas apresentaram, em sua maioria, carga parasitária inferior a  $10^2$  parasitos/ 100 ng de DNA, não permitindo uma quantificação precisa do número de parasitos presentes na amostra. No entanto, esses resultados apontam a presença de baixos níveis de parasitismo tecidual em animais inoculados por via oral. Um número maior de parasitos foi encontrado no coração de animais infectados com 50% de ambas as cepas na fase aguda da doença, no entanto não foram detectadas cargas parasitárias superiores a  $10^4$  parasitos/ 100 ng de DNA. Na fase crônica houve uma diminuição do número de parasitos encontrados em todos os tecidos. Camundongos infectados oralmente com cepas TcI e TcIV apresentaram baixos níveis de parasitismo tecidual na fase aguda da infecção, no entanto, o número de parasitos encontrados na fase crônica foi superior aos detectados nesse trabalho (MAEDA et al, 2016) e camundongos infectados por vial com TcIV apresentaram carga parasitária acima de  $10^4$  parasitos / 30 mg de tecido na fase aguda da doença (TESTON et al., 2016). Os resultados encontrados por esses autores se devem principalmente ao fato de que nesses estudos foram utilizadas cepas provenientes de pacientes infectados por via oral em fase aguda da doença de Chagas, sugerindo que esses isolados estejam mais adaptados aos mecanismos que determinam a patogenia na infecção oral.

Embora o *T. cruzi* TcI esteja envolvido em surtos da doença de Chagas aguda adquirida por via oral (MARCILI et al., 2009; VALENTE et al., 2009; MONTEIRO et al., 2013) e que algumas cepas dessa linhagem sejam capazes de provocar infecção experimental por via oral em camundongos (CAMANDAROBÁ et al., 2002; DIAS et al., 2013), a cepa TcI SC25RFP não foi capaz

de infectar camundongos BALB/c pela via oral. A hipótese levantada para elucidar essa questão era de que os parasitos da cepa SC25RFP pudessem ser degradados em contato com o suco gástrico. Contudo, dados da literatura mostram que formas tripomastigotas possuem glicoproteínas de superfície que impedem sua degradação frente ao ambiente ácido do estômago (MORTARA et al., 1992; COVARRUBIAS et al., 2007). No presente estudo, quando tripomastigotas de cultura da cepa SC25RFP TcI foram incubados por 1 hora com pepsina em tampão citrato pH 3,5, simulando o ambiente gástrico, observamos que a morfologia e motilidade dos parasitos se manteve preservada.

Apesar da pepsina não provocar a morte das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, essa enzima pode ter efeito na degradação de glicoproteínas específicas que estão associadas à invasão celular (COVARRUBIAS et al., 2007). Para verificar se esse fenômeno ocorreu durante a infecção oral com a cepa SC25RFP, formas tripomastigotas tratadas com pepsina em tampão citrato pH 3,5 durante 1 hora foram utilizadas para infectar células da linhagem Vero. Após 24 horas de infecção, observou-se que os tripomastigotas tratados com pepsina apresentaram uma redução estatisticamente significativa na taxa de infecção celular em relação aos parasitos não tratados, sugerindo que o contato com o ambiente gástrico pode ter reduzido a capacidade de infecção para camundongos. A capacidade reduzida de invasão celular durante a infecção oral apresentada pela cepa SC25RFP (TcI), pode estar associada a ineficiência de formas tripomastigotas migrarem através da mucosa gástrica e atingirem células epiteliais iniciando o processo de invasão e multiplicação (MAEDA et al., 2016). Tripomastigotas da cepa YGFP (TcII) tratados e não tratados com pepsina não apresentaram diferença nos perfis de infecção para células Vero.

Os tecidos dos animais inoculados com as cepas transfectadas e suas misturas foram analisados com relação à intensidade do processo inflamatório e parasitismo tecidual com o uso da técnica de histopatologia convencional. Nos tecidos coletados no tempo 1 (24 horas após a inoculação), não foram observadas alterações histopatológicas e presença de parasitismo tecidual. Contudo, a PCR convencional e a qPCR foram capazes de detectar parasitos presentes no reto dos

animais infectados com tripomastigotas TcII e nos grupos onde foram inoculados misturas de parasitos TcI e TcII. Ao utilizar a qPCR na detecção de parasitos presentes em amostras de sangue de animais infectados com *T. cruzi*, Caldas e colaboradores (2012) observaram maior sensibilidade desta técnica com relação a exames de sangue a fresco, principalmente durante a fase crônica da doença, onde os níveis de parasitemia são extremamente baixos. O mesmo foi observado em amostras de tecidos de animais infectados, onde tanto a PCR convencional quanto a qPCR apresentaram maior capacidade de detecção de parasitismo tecidual em relação às análises histopatológicas (GRUENDLING et al., 2015; DOMINGUES et al., 2016).

Na fase aguda (22 d.p.i.) foram observadas alterações histopatológicas em todos os órgãos analisados, com exceção do baço, que não apresentou alterações teciduais em comparação ao grupo não infectado. As alterações mais significativas foram observadas no coração com a presença de infiltrados inflamatórios de grau moderado a intenso e presença de parasitismo tecidual de grau discreto a intenso. Esses resultados já eram esperados uma vez que a cepa Y apresenta conhecido tropismo pelo tecido cardíaco e raramente é encontrada causando alterações teciduais no baço (PENIN et al., 1990; DIEGO et al., 1991).

O comportamento da cepa Y em infecção oral parece diferir da infecção clássica (intraperitoneal) apenas com relação à intensidade da inflamação e parasitismo tecidual, onde animais infectados por via intraperitoneal apresentam níveis mais elevados de inflamação e parasitos presentes no tecido. Embora o tropismo pelo tecido cardíaco se mantenha na infecção oral, foram encontrados focos inflamatórios de grau discreto a moderado no estômago de todos os animais infectados com TcII durante a fase aguda da infecção, embora na ausência de parasitos na histopatologia. A baixa sensibilidade da técnica histopatológica pode ter contribuído para a não detecção de parasitismo tecidual no estômago de camundongos infectados. Resultados semelhantes foram reportados por Domingues e colaboradores (2016) ao infectar oralmente camundongos BALB/c com parasitos da cepa Tulahuén.

A detecção de um número maior de parasitos em coração de animal inoculado com uma mistura de igual proporção de

parasitos TcI e TcII pela qPCR foi comprovada após análise histopatológica desse mesmo tecido. Foi observado grau intenso de parasitismo tecidual (>10 ninhos de amastigotas) acompanhado de intenso processo inflamatório. Estes resultados revelam a eficiência e sensibilidade da técnica de qPCR que detectou e quantificou o parasitismo tecidual de maneira mais rápida e menos laboriosa que a técnica histopatológica.

Na fase crônica (45 d.p.i.), foi observada uma diminuição da intensidade do processo inflamatório e ausência de parasitismo tecidual em todos os grupos infectados com parasitos TcII em diferentes proporções. Animais infectados com diferentes cepas TcII por via intraperitoneal também apresentaram uma diminuição ainda que discreta da intensidade de inflamação e parasitismo tecidual na fase crônica (GRUENDLING et al., 2015). Já animais infectados por via oral com as cepas CL e G e acompanhados por um período de 6 meses após a infecção apresentaram um aumento nos níveis de inflamação durante a fase crônica (RODRIGUES et al., 2016).

A dinâmica da infecção de *T. cruzi* por via oral, bem como a dinâmica das co-infecções com o envolvimento de diferentes linhagens do parasito têm se mostrado bastante diversificada. Não há indícios que possam associar a presença de um genótipo em particular com a determinação do curso da infecção. Os resultados apresentados até o momento sugerem que a dinâmica da infecção por via oral com misturas de cepas estejam mais associadas as características de infecciosidade de cada cepa ou isolado de *T. cruzi*, que propriamente associadas às DTUs a que elas pertençam.





## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que:

- A transfecção das cepas SC25 e SC96 com os plasmídeos pTREXRFPNeo e pTREXGFPNeo respectivamente, permitiu obter linhagens estáveis de parasitos transfectados;
- O processo de transfecção não alterou as características morfológicas e de crescimento dos epimastigotas transfectados com relação as cepas parentais;
- O desenvolvimento de parasitos expressando proteínas fluorescentes possibilitou o estudo da dinâmica das co-infecções *in vitro* e *in vivo*;
- Populações mistas de parasitos SC25RFP e YGFP em diferentes proporções ocasionaram taxas de infecção em células THP-1 inferiores às apresentadas pelas cepas isoladamente;
- A infecção de *Triatoma tibiamaculata* com misturas de parasitos da cepa SC25RFP e YGFP em diferentes proporções após 45 dias de infecção mostrou um predomínio de parasitos YGFP no curso da infecção;
- A cepa SC25RFP embora tenha ocasionado parasitemia sanguínea em camundongos inoculados pela via intraperitoneal, não foi capaz de infectar camundongos pela via oral;
- O tratamento de tripomastigotas de cultura da cepa SC25RFP com pepsina reduziu a capacidade de infecção para células THP-1;
- A intensidade do parasitismo tecidual determinado pela cepa YGFP em animais infectados com diferentes proporções de TcI e TcII pela via oral se assemelhou ao observado na infecção com a cepa parental;

- A cepa YGFP determinou maior intensidade do processo inflamatório e parasitismo tecidual durante a fase aguda da infecção de camundongos pela via oral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. & YÉPEZ, R. Evolución epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. Proceedings of the International Workshop on Populations Genetics and Control of Triatominae, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, 24-28 September, (1):30-38, 1995.

AMATO-NETO V, SHIKANAI-YASUDA MA, AMATO WS. Doença de Chagas aguda. In: Dias JCP, Coura JR, editores. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz; 1997. p. 323-52.

AMÚNARRIZ, M., CHICO, M.E., GUDERIAN, R.H. Chagas'disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 94:145-149, 1991.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. Rev Pat Trop, 3: 165-221. 1974.

ANDRADE, S.G., ANDRADE, V., ROCHA-FILHO, F.D., BARRAL-NETTO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo, 23: 245-50. 1981.

ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev Soc Bras Med Trop, 18 (suppl.): 39-46.1985.

ANDRADE, S.G., MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop, 30: 27-35. 1997.

ANDRADE SG, CAMPOS RF, STEINDEL M, GUERREIRO ML, MAGALHÃES JB, ALMEIDA MC, REIS JN, SANTOS VC, VALADARES HMS, REIS MG, MACEDO, AM. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains

isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106, 000-000.

ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94, 429-32.

ARAUJO, CAC, CABELLO PH, JANSEN AM. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: *In vitro* and in the intestinal tract of the a blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. Acta Tropica 101 225–231; 2007.

ARAÚJO CAC, WANIEK PJ, JANSEN AM. TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. Parasites & Vectors 7:94, 2014.

AUFDERHEIDE AC, SALO W, MADDEN M, STREITZ J, BUIKSTRA J, GUHL F, ARRIAZA B, RENIER C, WITTMER LE JR, FORNACIARI G, ALLISON. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 2034-9.

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE J, SILVA-DOS-SANTOS D, PÉREZ AR, BERBERT LR, SANTANA-VAN-VLIET ED, FARIAS-DE-OLIVEIRA DA, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLoS Negl Trop Dis 9(6): e0003849, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003849

BASILE, L., JANSÁ, J.M., CARLIER, Y., SALAMANCA, D.D., ANGHEBEN, A., et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. Euro Surveill 16:19968, 2011.

BASTOS CJC, ARAS R, MOTA G, REIS F, DIAS JP, et al. Clinical Outcomes of Thirteen Patients with Acute Chagas Disease Acquired through Oral Transmission from Two Urban Outbreaks in Northeastern Brazil. PLoS Negl Trop Dis 4(6): e711. doi:10.1371/journal.pntd.0000711; 2010.

BORST P, VAN DER PLOEG M, VAN HOEK JFM, TAS J, JAMES J. On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 1982; 6: 13-23.

BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962; 4: 389-96.

BRENER, Z, CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 5: 220-4. 1963.

BRENER Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol* 1973; 27: 347-82.

BRENER, Z, COSTA, CAG, CHIARI, C. Differences in susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 18: 450-5. 1976.

BRENER Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: Dias JCP, Coura JR, editores. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz; 1997. p. 25-31

BRENER, Z, ANDRADE, Z, BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRISSE, S, BARNABÉ, C, TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*, 30: 35-44. 2000.

BRUMPT E. *Précis de Parasitologie*, Paris, masson, Tome I, 1931.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 550–76, 2010. doi:10.1128.

CALDAS S, CALDAS IS, DINIZ LDE F, LIMA WG, OLIVEIRA RDE P, CECÍLIO AB, RIBEIRO I, TALVANI A, BAHIA MT. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop.* Sep;123(3):170-7, 2012. doi: 10.1016.

CAMANDAROBA, ELP, PINHEIRO LIMA, CM, ANDRADE, SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop SPaulo* 2002; 44: 97-103.

CAMPBELL, D. A., THOMAS, S., STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect*, 5, 13: 1231-1240. 2003.

CARDOSO, FA. Sur le mecanisme de la transmission de la maladie de Chagas. *Annals Parasitology. Human. Comparative* 16: 341-349, 1933.

CARPINTERO, DJ. Proposição para la investigación de puerta de entrada desconocida em enfermidade de Chagas – Mazza. *Gazeta Veterinaria* 40(330): 280, 1978.

CHAGAS C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159-218.

CHAPMAN, MD, BAGGALEY, RC, GODFREY-FAUSSET, PF, MALPAS, TJ, WHITE, G, CANESE, J, MILES, MA. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J Protozool*, 31: 482-6. 1984.

CORASSA RB, ACEIJAS C, ALVES PAB, GARELICK H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. *Month* 201X Vol XX No X I Perspectives in Public Health ISSN 1757-9139, 2016. DOI: 10.1177/1757913916671160.

CORTEZ, M, NEIRA, I, FERREIRA, D, LUQUETTI, AO, RASSI, A, ATAYDE, VD, YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi*

metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infection and Immunity*, p. 6184–6191, 2003.

CORTEZ M, ATAYDE VD, YOSHIDA N. Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 8:1502-1512. 2006.

CORTEZ M, MARTINS, RM, ALVES, RM, SILVA, RC, BILCHES, LC, MACEDO, S, ATAYDE VD, KAWASHITA SY, BRIONES, MRS, YOSHIDA N. Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from y strain. *PLoS Negl Trop Dis* 6(10): e1804. doi:10.1371/journal.pntd.0001804.

COVARRUBIAS C, CORTEZ M, FERREIRA D, YOSHIDA N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *International Journal for Parasitology* 37(14):1609-16, 2007.

COURA JR. Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. *Rev Soc Bras de Med Trop* 2006; 39 (supl. 4): 113-7.

COURA JR. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (supl. I): 113-22.

COURA, J.R, DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 31–40, 2009.

COURA JR E VIÑAS PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature Outlooks*. 2010

CRUZ L, VIVAS A, MONTILLA M, HERNÁNDEZ C, FLÓREZ C, PARRA E, RAMÍREZ JD. Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infection, Genetics and Evolution* 29: 110–117, 2015.

DA ROCHA, W.D.; SILVA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C., PIRES, S.F., FREITAS, J.M., MACEDO, A.M., VAZQUEZ, M.P., LEVIN, M.J., TEIXEIRA, S.M.. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* 92 (2):113-20, 2004.

DARIO MA, RODRIGUES MS, BARROS JHS, XAVIER SCC, D'ANDREA PS, ROQUE ALR JANSEN AM. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasites & Vectors* 9:477, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1754-4.

DAVIS DS, RUSSEL LH, ADAMS LJ. An experimental infection of *Trypanosoma cruzi* in striped skunks (*Mephitis mephitis*). *Journal of Wildlife Diseases* 16(3):403, 1980.

DEGRAVE W, FRAGOSO SP, BRITTO C, VAN HEUVERSWYN H, KIDANE GZ, CARDOSO MA, MUELLER RU, SIMPSON L, MOREL CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 27: 63-70. 1988.

DE NOYA BA, DÍAZ-BELLO Z, COLMENARES C, RUIZ-GUEVARA R, MAURIELLO L, ZAVALA-JASPE R, SUAREZ JA, ABATE T, NARANJO L, PAIVA M, RIVAS L, CASTRO J, MÁRQUES J, MENDOZA I, ACQUATELLA H, TORRES J, NOYA O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010; 501: 1308-15.

DE NOYA BA, DÍAZ-BELLO Z, COLMENARES C, RUIZ-GUEVARA R, MAURIELLO L, MUÑOZ-CALDERÓN A, NOYA O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 110(3): 377-386, 2015.

DIAS JCP. Acute Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 85-79.



DIAS JCP, COURA JR. Epidemiologia. In JCP Dias, JR Coura, editores. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz; 1997. p. 33-66.

DIAS JCP, MACEDO VO. Doença de Chagas. In: Coura JR., editor. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2005. v 1. p. 557-593.

DIAS J.C. Chagas disease: successes and challenges. Cad.Saude Publica22, 2020-2021. 2006.

DIAS JCP, PRATA AR, CORREIA D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41: 193-6.

DIAS GBM, GRUENDLING AP, ARAÚJO SM, GOMES ML, TOLEDO MJO. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. Exp Parasitol 135 (2013) 511–517.

DIAS UNGRÍA C. Transmisión experimental del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados: La contaminación bucal a partir de heces de *Rhodnius prolixus*. Revista Veterinaria Venezolana 16(95): 341, 1964.

DIAS UNGRÍA C. La via bucal en la transmisión de las tripanosomiasis animales. Boletín de La Academia de Ciencias Físicas e Matemática e Naturales 27(74) 33. 1967.

DIAS UNGRÍA C, SOTO BRACHO J. Camino que sigue el *Trypanosoma cruzi* en perros infectado por la vía bucal: nuevos estudios. Revista Veterinaria Venezolana 29(171): 271, 1970.

DIAS UNGRÍA C, ZEUSS M. Transmisión del *Trypanosoma evansi* y del *Trypanosoma cruzi* a partir de heces de animales infectados por vía bucal. Revista Veterinaria Venezolana 30(176): 187, 1971.

DIEGO JA, PENIN P, DEL REY J, MAYER R, GAMALLO C. A comparative pathological study of three strains of *Trypanosoma cruzi* in an experimental model. Histol Histopath 6: 199-206, 1991.

DOMINGUES CS, HARDOIM DJ, SOUZA CSF, CARDOSO FO, MENDES VG, PREVITALI-SILVA H, et al. Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. PLoS ONE 10(10): e0122566, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0122566.

DOS SANTOS WG, BUCK GA. Simultaneous stable expression of neomycin phosphotransferase and green fluorescence protein genes in *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol. 86(6):1281-8, 2000.

FALLA A, HERRERA C, FAJARDO A, MONTILLA M, VALLEJO GA, GUHL F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop, 110: 15-21. 2009.

FERREIRA BL, ORIKAZA CM, CORDERO EM, MORTARA RA. *Trypanosoma cruzi*: single cell live imaging inside infected tissues. Cellular Microbiology 18(6), 779–783, 2016.

FILARDI LS, BRENER Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81: 755-9.

FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, BASTOS-RODRIGUES L, GONÇALVES VF, TEIXEIRA SMR, CHIARI E, JUNQUEIRA ACV, FERNANDES O, MACEDO AM, MACHADO CR, PENA SDJ. Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathogens 2006; 2(3): e24.

GALVÃO, C., JUSTI, S.A. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Acta Tropica 151:116-125, 2015.

GARCIA ES, SUBRAHMANYAM B, MULLER TH, REMBOLD H. Absorption, storage, organ distribution and excretion of dietary 22,23-<sup>3</sup>H<sub>2</sub> dihydroaxadirachtin A in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. J. Insect Physiol 1989; 35: 742-749.

GASCON, J., BERN, C., PINAZO, M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other nonendemic countries. Acta Trop 115: 22–27, 2010.

GOMES ML, MACEDO AM, VAGO AR, PENA SD, GALVÃO LM, CHIARI E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998; 88: 28-33.

GOYARD S, LOURENÇO PD, DEOLINDO P, AUTHEMAN D, D'ARCHIVIO S, MINOPRIO P. In vivo imaging of trypanosomes for a better assessment of host-parasite relationships and drug efficacy. *Parasitol Inter* 63 (2014) 260–268.

GRUENDLING AP, MASSAGO M, TESTON ANM, MONTEIRO WM, KANESHIMA EN, ARAUJO SM et al. Impact of Benznidazole on Infection Course in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 92(6) pp. 1178–1189, 2015. doi:10.4269/ajtmh.13-0690

GUEVARA P., DIAS M., ROJAS A., CRISANTE G., ABREU-BLANCO M.T., UMEZAWA E., VAZQUEZ M., LEVIN M., ANEZ N., RAMIREZ J.L. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J. Med. Entomol.* 42, 48-56. 2005.

HENRIKSSON J, ASLUND L, MACINA RA, FRANKE DE CAZZULO BM, CAZZULO JJ, FRASCH AC, PETTERSSON U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 42: 213-24.

HERRERA, C., BARGUES, M.D., FAJARDO, A., MONTILLA, M., TRIANA, O., VALLEJO, G.A., GUHL, F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol*, 7: 535-9. 2007.

HOFT DF, FARRAR PL, KRATZ-OWENS K, SHAFFER D. Gastric Invasion by *Trypanosoma cruzi* and Induction of Protective Mucosal Immune Responses. *Infection and Immunity*., p. 3800±3810. 1996. 0019-9567/96/\$04.0010.

JAWETZ E, MELNICK JL, ADELBURG EA, BROOKS GF, BUTEL JS, ORNSTON LN. O crescimento, a sobrevivência e a morte de microorganismos. In: Microbiologia médica. 18ª Edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

KIRCHHOFF LV. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). *Adv Parasitol*, 75: 1-18. 2011.

KOFOID CA, DONAT F. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* from the intestine of conenose bug: *Triatoma protracta*. *Proceedings of Society Experimental Biology* 30: 489-491, 1933.

KUEHN CC, OLIVEIRA LGR, MIRANDA MA, PRADO JC. Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection. *Parasitology* 141: 904–913, 2014. doi:10.1017/S0031182013002059

LAINSON R, SHAW JJ, NAIFF RD. – Chagas' disease in the Amazon Basin: Speculation on transmission *per os*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 22: 294-297. 1980.

LEE, B.Y., BACON, K.M., BOTTAZZI, M.E., HOTEZ, P.J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 13: 342–348, 2013.

LUKES, J.; GUILBRID, L.; VOTÝPKA, J.; ZIKOVÁ, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P.T. Kinetoplast DNA Network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, 4(1): 495-502. 2002.

LUQUETTI AO, RASSI A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In Z Brener, Z Andrade, M Barral-Netto (Org.). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000; p. 344-348.

MAEDA FY, CLEMENTE TM, MACEDO S, CORTEZ C, YOSHIDA N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from

chagasic patients. *Parasites & Vectors* 9:189, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1455-z

MACEDO, A.M., MARTINS, M.S., CHIARI, E., PENA, S.D.J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol*, 55: 147-54. 1992.

MACEDO A.M. e PENA S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* 14, 119-123. 1998

MACEDO AM, MACHADO C, OLIVEIRA R, PENA S. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 1-12.

MANTILLA JC, ZAFRA GA, MACEDO AM, GONZÁLEZ CI. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Hum Pathol* 41: 610–613, 2010.

MANZULLO EC, CHUIT R. Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (supl. I): 317-20.

MARCILI A., VALENTE, V.C., VALENTE S.A., JUNQUEIRA A.C., DA SILVA F.M., PINTO A.Y., *et al.* *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* 39: 615-623. 2009.

MAYER HF. Infección experimental com *T. cruzi* por la via digestiva. *Anais del Instituto de Meicina Regional*, 5(3): 43, 1961.

MAZZA S, SCHURMANN K. Infección espontánea del quirquincho en Jujuy por el *Trypanosoma cruzi*. 6 Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte, 1930.

MAZZA S, ROMANA C, SCHURMANN K. Infección espontánea del armadillo del país por El *Trypanosoma cruzi*. Hallazgo de este flagelado en *Dasypus novencinctus* del Chaco santafezino. *Prensa Medica. Argentina* 17: 1350, 1931.

MELO RC, BRENER Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J Parasitol, 64: 475-82. 1978.

MENDONÇA MBA, NEHEME NS, SANTOS SS, CUPOLILLO E, VARGAS N, JUNQUEIRA A, NAIFF RD, BARRET TV, COURA JR, ZINGALES B, FERNANDES O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. Parasitol, 124: 177-84. 2002.

MILES MA, TOYE, P.J., OSWALD, S.C., GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.71, p.217-225, 1977.

MILES, M.A., SOUZA, A.A., POVOA, M., SHAW, J.J., LAINSON, R., TOYE, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature, v.272, p.819-821, 1978.

MILES, M.A., LANHAN, S.M., DE SOUZA, A.A., POVOA, D.G. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.74, p.221-242, 1980.

MILES, M.A., PÓVOA, M.M., SOUZA, A.A., LAINSON, R., SHAW, J.J., KETTERIDGE, D.S. Chagas' disease in the Amazon Basin. II. Distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, 75: 667-74. 1981.

MILES MA, LLEWELLYN MS, LEWIS MD, YEO M, BALEELA R, FITZPATRICK S, GAUNT MW, MAURICIO IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. Parasitology. 2009 Oct;136(12):1509-28.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos de Doença de Chagas Aguda (DCA), 2007 a 2011, Brasil. 2013. Disponível em

[Http://portal.saude.gov.br/portal/saudeprofissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saudeprofissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454), acessado: 04/01/2014.

MIRANDA CG, SOLANA ME, CURTO MA, LAMMEL EM, SCHIJMANB AG, SOTO CDA. A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 152 8–16, 2015.

MONTEIRO, W.M., MAGALHAES, L.K.C., SA, A.R.N. GOMES, M.L., TOLEDO, M.J.O., BORGES, L., PIRES, I., GUERRA, J.A.O., SILVEIRA, H., BARBOSA, M.G.V. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*, 7: 41284. 2012.

MOREL, C.M., CHIARI, E., CAMARGO, E.P., MATTEI, D.M., ROMANHA, A.J., SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 6810-4. 1980.

MYLER, P.J. Molecular variation in trypanosomes. *Acta Trop*, 53: 205-25. 1993.

NATAN-LARRIER L. Infections à Trypanosomes at voies de pénétrations des virus. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 14:537-542, 1921.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigote Surface Molecule gp82 in Adhesion to Gastric Mucin and Invasion of Epithelial Cells. *Infection and immunity*, v.71, p. 557-561, 2003.

NUSSEINZWEIG, V., GOBLE, F.C. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Exp Parasitol*, 18: 224-30. 1966.

OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, CL.; PENA, S.D. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Genetics*, v.95, p.3776– 3780, 1998.

OLIVEIRA, R.P.; MELO, A.I.R.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. The Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. Expanded Analysis of 54 Strains Using Eight Polymorphic CA-repeat Microsatellites. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.94, p.65-70, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. 2009.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Rio de Janeiro: PAHO; 2006.

PEDROSO A, CUPOLILLO E, ZINGALES B. *Trypanosoma cruzi*: Exploring the nuclear genome of zymodeme 3 stocks by chromosome size polymorphism. Exp Parasitol 2007; 116: 71-6.

PENA DA, EGER I, NOGUEIRA L, HECK N, MENIN A, BÁFICA A, STEINDEL M. Selection of TcII *Trypanosoma cruzi* population following macrophage infection. J Inf Dis, 2011; 204: 478-86.

PENIN P, DIEGO J, DEL REY J, MAYER R, GAMALLO C. Acute chagasic cardiopathy produced by a strain of *Trypanosoma cruzi* (type I) in an experimental model. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 65 : n° 5-6, 208-213, 1990.

PINTO AYN, VALENTE SAS, VALENTE VC, FERREIRA-JUNIOR AG, COURA JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41: 602-14.

PINTO AS, LANA M, BRITTO C, BASTRENTA B, TIBAYRENC M. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. Intern Jour for Parasit 30 843-848, 2000.

PIRES SF, DAROCHA WD, FREITAS JM, OLIVEIRA LA, KITTEN GT, MACHADO CR, PENA SDJ, CHIARI E, MACEDO AM, TEIXEIRA SMR. Cell culture and animal infection with



distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *Int J Parasitol* 2008; 38: 289–297

PEREZ-AYALA, A., PEREZ-MOLINA, J.A., NORMAN, F., NAVARRO, M., MONGE-MAILLO, B., et al. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect* 17: 1108–1113, 2011.

PRATA A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100, 2001.

RAMIREZ M.I., YAMAUCHI L.M., DE FREITAS L.H.J., UEMURA H., SCHENKMAN S. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 111(1):235-40, 2000.

RAMIREZ JD, MONTILLA M, CUCUNUBA ZM, FLOREZ AC, ZAMBRANO P, et al. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 7(2): e2041, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002041

RASSI, A. JR., RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402, 2010.

RICKMANN, C. Epizootology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North American. *Journal Entomology of Honolulu.* 2(1): 87, 1966.

ROCHA MN, CORRÊA CM, MELO MN, BEVERLY SM. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein *Diagn Microbiol Infect Dis.* 75(3): 282–291. 2012. doi:10.1016/j

RODRIGUES AA, NOTÁRIO ANO, TEIXEIRA TL, SILVA RT, QUINTAL APN, ALVES RN, BRÍGIDO PC, et al. A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection. *Acta Tropica* 157: 42–53, 2016.

RODRIGUES CM, VALADARES HMS, FRANCISCO AF, ARANTES JM, CAMPOS CF, et al. Coinfection with Different

*Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection. PLoS Negl Trop Dis; 2010; 4(10): e846. doi:10.1371/journal.pntd.0000846.

RODRIGUEZ B, MAYA B, BLANCO M, NICHOLLS S, HERNÁNDEZ CA, GUALDRÓN LE. Estudio de un brote de carditis chagásica aguda en una población adulta. Acta Médica Colombiana 17(Sup.1):280, 1992.

ROELLIG DM, ELLIS AE, YABSLEY MJ. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. J Parasitol, 95(2): 360–364, 2009. doi:10.1645/GE-1740.1.

ROMANHA, A.J. Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas gerais, 1982.

ROMANHA, A.J., ALVES, R.O., MURTA, S.M., SILVA, J.S., ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. J Infect Dis, 186: 823-828. 2002.

ROQUE, A.L., XAVIER, S.C., DA ROCHA, M.G., DUARTE, A.C., D'ANDREA, P.S., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. The American Journal of Tropical Medicine Hygiene 79(5):742-9, 2008 Nov.

RUIZ, R.C.; FAVORETO, S.; DORTA, M.L.; OSHIRO, M.E.M.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* stains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential  $\text{Ca}^{2+}$  signaling activity. The Biochemical journal, v.330, p. 505-511, 1998.

SALVADOR, F., TREVINO, B., SULLEIRO, E., POU, D., SANCHEZ-MONTALVA, A., et al. *Trypanosoma cruzi* infection in

a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. Clin Microbiol Infect 20: 706–712, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SCHMUÑIS GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (supl. I): 75-85.

SHIKANAI-YASUDA MA, MARCONDES CB, GUEDES LA, SIQUEIRA GS, BARONE AA, DIAS JC, *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1991; 3:351-7.

SILVEIRA AC. Profilaxia. In: Z Brener, ZA Andrade, M Barral Neto (editores), *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 75-87.

SOUTO, R.P., ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol Biochem Parasitol, 62: 45-52. 1993.

SOUTO RP, FERNANDES O, MACEDO AM, CAMPBELL DA, ZINGALES B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1996; 83: 41-152.

SPITZNER FL, FREITAS JM, MACEDO AM, ORNELAS TOLEDO MJ, ARAÚJO SM, *et al.* *Trypanosoma cruzi*-triatomine associations and the presence of mixed infections in single triatomine bugs in Paraná state, Brazil. Acta Parasitologica 52: 74–81, 2007.

STEINDEL, M., DIAS NETO, E., MENEZES, C.L.P., ROMANHA, A.J., SIMPSON, A.J.G. Random Amplified Polymorphic DNA

analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Molecular Biochemical Parasitology, v.60, p.7180, 1993.

STEINDEL M, TOMA HK, ISHIDA MMI, MURTA SMF, PINTO CJC, GRISARD EC, SCHLEMPER JR BR, RIBEIRO-RODRIGUES R, ROMANHA AJ. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. Act Trop, 60: 167-177.1995.

STEINDEL M, KRAMER-PACHECO L, SCHOLL D, SOARES M, MORAES MH, EGER I, KOSMANN C, SINCERO TC, STOCO PH, MURTA SM, CARVALHO-PINTO CJ, GRISARD EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 60 (1): 25-32.

TESTON APM, ABREU AP, ABEEG CP, GOMES ML, TOLEDO MJO. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. Acta Tropica. 166: 212-217, 2016.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetically, taxonomic and epidemiological significance. Evolution, v.42, p. 277-292, 1988.

TOMA HK, CERÁVOLO IP, GUERRA HL, STEINDEL M, ROMANHA AJ. *Trypanosoma cruzi*: parasitaemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. Int J Parasitol 2000; 30: 593-597.

VAGO AR, ANDRADE LO, LEITE AA, D'AVILA REIS D, MACEDO AM, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am J Pathol 156: 1805 -1809, 2000.

VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas

Disease in the Brazilian Amazon. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz94:395-398, 1999.

VALENTE, S. A. S., VALENTE, V. C., PINTO, A. Y. N., CÉSAR, M.J.B., SANTOS, M.P., MIRANDA, C.O.S., CUERVO, P., FERNANDES, O., Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 103:291-297, 2009.

VARGAS, J.C.P., ESPINOZA, E., RIOS, T., BRUTUS, L. First reported outbreak of Chagas disease in the Bolivian amazonian zone: a report of 14 cases of oral transmission of acute *Trypanosoma cruzi* in Guayaramerín, Beni-Bolivia. BIOFARBO: 19, 52–58, 2011.

VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J. Functional analysis of the regions os TcP2β gene loci allow the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239: 217-225, 1999.

ZINGALES, B., SOUTO, R.P., MANGIA, R.H., LISBOA, C.V., CAMPBELL, D.A., COURA, J.R., JANSEN, A., FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol*, 28: 105-12. 1998.

ZINGALES B, ANDRADE SG, BRIONES MRS, CAMPBELL DA, CHIARI E, FERNANDES O, GUHL F, LAGES-SILVA E, MACEDO AM, MACHADO CR, MILES MA, ROMANHA AJ, STURM NR, TIBAYRENC M, SCHIJMAN AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (7): 1051-4.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Geneva: WHO; 2005.

YEO M, MAURICIO I, MESSENGER LA, LEWIS MD, LLEWELLYN MS, ACOSTA N, BHATTACHARYYA T, DIOSQUE P, CARRASCO HJ, MILES MA. Multilocus Sequence Typing (MLST) for Lineage Assignment and High Resolution Diversity

Studies in *Trypanosoma cruzi*. PloS Negl Trop Dis, 5(6): e1049. doi:10.1371/journal.pntd.0001049. 2011.

YOSHIDA N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cien 78(1):87-111. Epub 2006.

YOSHIDA N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitol Inter 57(2):105-9, 2008.